

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JAQUELINE PEGORETTI

Avaliação da acurácia de métodos fenotípicos propostos por manuais de referência na classificação de *Klebsiella pneumoniae* carreadora do gene *bla*_{KPC}.

VITÓRIA

2017

JACQUELINE PEGORETTI

Avaliação da acurácia de métodos fenotípicos propostos por manuais de referência na classificação de *Klebsiella pneumoniae* carreadora do gene *bla*_{KPC}.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Nunes Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

P376a Pegoretti, Jaqueline, 1987 -
Avaliação da acurácia de métodos fenotípicos propostos por manuais de
referência na classificação de *Klebsiella pneumoniae* carreadora do gene bla
KPC / Jaqueline Pegoretti – 2017.
82 f. : il.

Orientador: Ana Paula Nunes Ferreira.
Coorientador: Ricardo Pinto Schuenck.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Doenças Transmissíveis. I. Ferreira, Ana
Paula Nunes. II. Schuenck, Ricardo Pinto. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

A mestrande JAQUELINE PEGORETTI apresentou a dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DE MÉTODOS FENOTÍPICOS PROPOSTOS POR MANUAIS DE REFERÊNCIA NA CLASSIFICAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARREADORA DO GENE *bla_{KPC}*" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) aprovar () reprovar a dissertação habilitando a farmacêutica JAQUELINE PEGORETTI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 12 de abril de 2017.


Prof.^a Dr.^a Lilliana Cruz Spano

(Membro Interno)


Prof.^a Dr.^a Polyana Silva Pereira

(Membro Externo)


Prof.^a Dr.^a Ana Paula

(Orientadora)

Dedico este trabalho com profunda gratidão e amor,

Aos que me deram a vida:

Luiz Paulo Pegoretti e Shirley Pimenta Pegoretti

À minha irmã Caroline Pegoretti

E ao marido Rafael Louzada Charpinel Goulart

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me abençoou com o dom da vida, me deu proteção, iluminou meus passos e me guiou pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, Luiz Paulo e Shirley e minha irmã Caroline, que compartilharam comigo meus ideais e os alimentaram e me incentivaram a prosseguir sem medo dos obstáculos, tornando a caminhada mais amena. Todas minhas conquistas e vitórias são dedicadas a vocês!

Ao meu amor Rafael – meu equilíbrio – pela incansável boa vontade em me ajudar e pelo apoio, paciência e incentivo em todos momentos. Enfim, obrigada por ser um grande amigo e companheiro. Amo você!

A todos os familiares, amigos e colegas que acompanharam minha caminhada e sempre me incentivaram e torceram por mim.

A todas colegas do Laboratório de Resistência Bacteriana (RESBAC) e do Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana (LabCAS) que em algum momento contribuíram direta ou indiretamente para a realização do trabalho. Em especial, a colega Mirla Borghi, pela parceria durante a realização dos experimentos e toda troca de conhecimento ao longo da construção do trabalho.

Ao Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN-ES) pela boa vontade e disposição em fornecer as amostras utilizadas no estudo.

Ao co-orientador Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck pelo apoio em todas etapas do desenvolvimento do trabalho e pela contribuição científica para o aprimoramento do mesmo.

À minha orientadora Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes um agradecimento especial por ter auxiliado arduamente com paciência, dedicação e carinho sempre me estimulando e guiando até a concretização do trabalho. Obrigada por dividir comigo suas experiências e acreditar na minha capacidade. É uma honra ser sua orientanda.

- 2000 A.C. – Agora, coma esta raiz.
- 1000 D.C. – Aquela raiz é pagã. Agora, diga esta oração.
- 1850 D.C. – Aquela oração é superstição. Agora, beba esta poção.
- 1920 D.C. – Aquela poção é óleo de serpente. Agora, tome esta pílula.
- 1945 D.C. – Aquela pílula é ineficaz. Agora, leve esta penicilina.
- 1955 D.C. – “Oops”... os micróbios mudaram. Agora, leve esta tetraciclina.
- 1960-1999 – 39 mais “oops” ... Agora, leve este antibiótico mais poderoso.
- 2000 D.C. – Os bichos ganharam! Agora, coma esta raiz...

Anônimo

RESUMO

Infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) são uma ameaça global à saúde pública e resultam no aumento da falha terapêutica e das taxas de mortalidade. Dentro da família *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae* produtora da carbapenemase KPC é o principal patógeno responsável por essas infecções e é alvo de grande preocupação devido seu alto potencial de disseminação. Para reduzir o atraso na terapia adequada e implementar as medidas de controle é essencial a detecção acurada deste mecanismo de resistência. Entretanto, isso representa um desafio para os laboratórios de microbiologia, pois os pontos de corte clínico recomendados pelos manuais de referência não são capazes de detectar todos os isolados produtores de carbapenemase e nenhum dos testes indicados como confirmatórios possuem 100% de sensibilidade e especificidade. O objetivo do estudo foi verificar a acurácia dos métodos e critérios interpretativos propostos pelos manuais *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) para detecção da produção de carbapenemase em 47 amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadora do gene *bla_{KPC}*. A susceptibilidade aos carbapenêmicos e os critérios de seleção das amostras para realização dos métodos confirmatórios empregados (Teste de Hodge Modificado e Teste de sinergismo com inibidores) foram avaliada através dos métodos de difusão a partir do disco (DD) e da determinação da concentração mínima inibitória utilizando os critérios interpretativos de ambos os manuais. Todas as amostras apresentaram fenótipo MDR. Os resultados indicaram que os pontos de corte clínico associados aos pontos de corte de triagem propostos pelo BrCAST mostraram melhor desempenho em selecionar corretamente as amostras de *K. pneumoniae* carreando o gene *bla_{KPC}* para os testes confirmatórios. Para garantir maior acurácia é crucial seguir estritamente o preconizado uso dos três carbapenêmicos e, além disso, foi observado que o método de DD seguindo os critérios do manual brasileiro foi o único capaz de selecionar corretamente todas as amostras para os testes confirmatórios. Ambos os testes fenotípicos foram capazes de detectar produção de carbapenemase nas mesmas 40 amostras e em 7 amostras os resultados nesses testes foram negativos apesar da presença do gene *bla_{KPC}*.

Palavras-chaves: *K. pneumoniae*, carbapenemase, KPC, CLSI, BrCAST.

ABSTRACT

Hospital infections caused by multidrug resistant bacteria constitute a serious public health problem worldwide associated with treatment failure and higher mortality rates. Among *Enterobacteriaceae* family, KPC-producing *K. pneumoniae* is an important pathogen responsible for these infections and have received the most attention because they have high potential to spread. Accurate detection of KPC producers is essential for infection control measures and antibiotic therapy. However, this is a major issue in microbiology laboratories, because the current clinical breakpoints used by reference guidelines are not capable to detect all carbapenemase producers and none confirmatory tests have 100% sensibility and specificity. The aim of the study was to evaluate methods and interpretative criteria proposed in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) manuals to detect carbapenemase production in 47 *K. pneumoniae* clinical samples carrying *bla_{KPC}* gene. The carbapenems susceptibility testing and the screening criteria to select samples to perform confirmatory tests (Modified Hodge Test and Inhibitor-based method) were performed through disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) determination and was interpreted according clinical breakpoints proposed by both guidelines. All clinical samples were classified as MDR (non-susceptibility to at least three antimicrobial classes). The results support that carbapenems clinical breakpoints plus criteria of screening to select strains proposed by BrCAST presented better performance to correctly select *K. pneumoniae* possessing *bla_{KPC}* strains to confirmatory tests. It is important to use all three carbapenems to ensure higher accuracy in susceptible testing. Furthermore, was observed that disk diffusion method applying BrCAST criteria was the only capable to correctly select all strains to confirmatory tests. Both confirmatory tests were able to identify carbapenemase production in the same 40 strains. Seven strains showed negative results on confirmatory tests in despite of the presence of *bla_{KPC}* gene.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenems, KPC, CLSI, BrCAST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama representando a relação entre MDR, XDR e PDR.	21
Figura 2 - Mecanismo de resistência aos antimicrobianos através da pressão seletiva.....	23
Figura 3 - Mecanismo de resistência aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos.....	27
Figura 4 - Distribuição mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC.....	33
Figura 5 - Algoritmo para detecção de carbapenemases.....	36
Figura 6 - MHT com ERT em placa de ágar MH 15 x 90mm..	42
Figura 7- Esquema dos discos de antimicrobianos para detecção de mecanismos de resistência a carbapenêmicos pelo teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases.	43
Figura 8 - Presença de colônias satélites na zona de inibição das amostras 31B e 36B para determinação da CMI do IPM utilizando fitas de M.I.C.E®.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos genes das 47 amostras clínicas de <i>K. pneumoniae</i>	39
Tabela 2- Pontos de cortes clínico dos carbapenêmicos para família <i>Enterobacteriaceae</i> (CLSI, 2016).....	44
Tabela 3 - Pontos de cortes clínico dos carbapenêmicos para a família <i>Enterobacteriaceae</i> (BrCAST, 2016).....	44
Tabela 4 - Pontos de corte para triagem de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases (BrCAST, 2015).	45
Tabela 5 - Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos pelo método de difusão em disco segundo os manuais de interpretação do CLSI e BrCAST.	48
Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos pelo método de determinação da CMI segundo os manuais de interpretação do CLSI e BrCAST. ...	49
Tabela 7 - Número de amostras de <i>K. pneumoniae</i> selecionadas para os testes confirmatórios pelos métodos de DD e determinação da CMI segundo os critérios do CLSI e BrCAST.	50
Tabela 8 - Perfil genético e fenotípico das 7 amostras de <i>K. pneumoniae</i> que apresentaram resultados negativos nos testes confirmatórios.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil de resistência aos antimicrobianos testados das 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das β -lactamases de acordo com Bush e Jacoby, 2010... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC - Amoxicilina-Clavulanato

AMI - Amicacina

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATM - Aztreonam

BA - Ácido Borônico

BGNs - Bacilos Gram-negativos

BrCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CA - Ácido Clavulânico

CAZ - Ceftazidima

CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CFO - Cefoxitina

CFZ - Cefazolina

CGP - Coco Gram-positivo

CIP - Ciprofloxacina

CLO - Cloranfenicol

CLOXA - Cloxacilina

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CPM - Cefepima

CTX - Cefotaxima

CVC - Cateter venoso central

DD - Difusão a partir do Disco

ECDC - *European Center for Disease Prevention and Control*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ESBL - β -lactamase de Espectro Estendido

EUA - Estados Unidos da América

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ERT - Ertapenem

GEN - Gentamicina

IPCSL - Infecção Primária da Corrente Sanguínea Laboratorial
IPM - Imipenem
IRAS - Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LACEN-ES - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo
LEV - Levofloxacina
LPS - Lipopolissacarídeo
MDR - Resistente a Múltiplas Classes de Antimicrobianos
MPM - Meropenem
MH - Mueller Hinton
MHT - Teste de Hodge Modificado
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
NDM - New Deli Metalobatalactamase
NIT - Nitrofurantoina
NOR - Norfloxacina
OFX - Ofloxacina
OMS - Organização Mundial de Saúde
OXA - Oxacilinase
PBA - Ácido Fenilborônico
PBP - Proteína ligadora de Penicilina
PDR - Pan Resistente aos Antimicrobianos
PIT - Piperacilina-Tazobactam
PRL - Piperacilina
R - Resistente
RI - Resistente Intermediária
S - Sensível
SENTRY - Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana
SUT - Trimethoprima-Sulfamethoxazole
TAC - Ticarcilina-Clavulanato
TET - Tetraciclina
TOB - Tobramicina
TSB - Caldo Soja Trypticaseína
TZB - Tazobactam
UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VRE - Enterococo Resistente à Vancomicina

XDR - Extremamente Resistente aos Antimicrobianos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS)	19
2.2	Infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos.....	21
2.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
2.4	Resistência aos antimicrobianos terapêuticos em <i>K. pneumoniae</i>	26
2.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase	30
2.6	Deteção de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase	33
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Amostras Bacterianas.....	39
4.2	Identificação fenotípica	40
4.3	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	40
4.4	Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos	41
4.4.1	Método de difusão do disco	41
4.4.2	Método de determinação da CMI.....	41
4.5	Métodos fenotípicos conformatórios para produção de carbapenemase	41
4.5.1	Teste de Hodge Modificado	41
4.5.2	Teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases	42
4.6	Crítérios de interpretação	43
4.6.1	CLSI.....	43
4.6.2	BrCAST	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Identificação fenotípica	46
5.2	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	46
5.3	Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos	47
5.3.1	Método de difusão do disco	47
5.3.2	Método de determinação da CMI.....	48
5.4	Seleção de amostras para realização dos testes confirmatórios	49
5.4.1	Método de difusão do disco	49
5.4.2	Método de determinação da CMI.....	49
5.5	Métodos fenotípicos confirmatórios para produção de carbapenemase	50
5.5.1	Teste de Hodge Modificado	50
5.5.2	Teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A.....	70

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório Global sobre a Resistência Bacteriana, publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2014, a resistência aos antimicrobianos é uma ameaça global à saúde pública. Infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos (MDR) resultam no aumento da falha terapêutica e das taxas de mortalidade, além de apresentarem impacto no tempo de internação e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos (KARAMPATAKIS et al., 2016).

Os bacilos Gram-negativos (BGNs) MDR possuem um papel de destaque como agentes causadores de infecções hospitalares graves. Dentre os membros da família *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae* é relatada como a principal bactéria responsável por essas infecções, principalmente devido ao fenótipo de resistência aos carbapenêmicos através da produção de carbapenemases. Além desse mecanismo de resistência aos carbapenêmicos existem outros frequentes entre os BGNs: diminuição da permeabilidade ao antimicrobiano devido à perda de porina, produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e produção de enzimas AmpC (BINA et al., 2015; KARAMPATAKIS et al., 2016).

Desde sua descoberta nos Estados Unidos da América (EUA) em 1996, a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) passou a ser alvo de grande preocupação em virtude do seu alto potencial de disseminação entre os BGNs, principalmente em espécies de *K. pneumoniae*, que é a principal espécie relacionada como produtora e responsável por sua rápida disseminação causando diversos surtos relatados mundialmente (LEE et al., 2016; MUNOZ-PRICE et al., 2013; NORDMANN, 2013).

A enzima KPC possui a habilidade de inativar os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e a maior parte dos outros antimicrobianos β -lactâmicos. Ademais, as bactérias produtoras desta enzima frequentemente são resistentes a numerosas classes de antimicrobianos com outros mecanismos de ação, fato que contribui para a severa limitação nas opções terapêuticas (BOYLE; ZEMBOWER, 2015). Inclusive, de acordo com um comunicado publicado pela OMS em 2017, existe uma necessidade urgente da pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos eficazes para combater infecções causadas por bactérias MDR. No topo da lista de

prioridade estão os BGNs resistentes aos carbapenêmicos como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e membros da família *Enterobacteriaceae*.

Com o objetivo de reduzir o atraso na terapia adequada e implementar as medidas de controle com ações voltadas para prevenir a disseminação das carbapenemases é de suma importância a rápida detecção deste mecanismo de resistência pelos laboratórios de microbiologia clínica. Entretanto, a presença da carbapenemase nem sempre resulta em resistência a altas concentrações de carbapenêmicos, sendo possível observar cepas com o gene para carbapenemase classificadas como susceptíveis a essa classe de antimicrobianos (BARTOLINI et al., 2014; BOYLE; ZEMBOWER, 2015; MUNOZ-PRICE et al., 2013).

Desse modo, os manuais de avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), preconizam a utilização do método de difusão a partir do disco (DD) e a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) por métodos como o de microdiluição em caldo ou a técnica de gradiente em escala para carbapenêmicos. Ainda, os manuais indicam que estes métodos sejam usados como triagem na seleção de amostras que deverão ser avaliadas por outros métodos fenotípicos ou genotípicos considerados confirmatórios para produção de carbapenemase ou presença do gene de carbapenemase, respectivamente. A pesquisa desse mecanismo de resistência é recomendada para todas as amostras de enterobactérias que apresentam sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos, uma vez que o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos pode estar associado a outros mecanismos como a produção de ESBLs ou produção de enzimas AmpC combinada com diminuição de permeabilidade da droga devido à perda de porina (BARTOLINI et al., 2014; BIRGY et al., 2012; BOYLE; ZEMBOWER, 2015; MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A determinação do perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos e a pesquisa de isolados produtores de carbapenemase representa um grande desafio para os laboratórios de microbiologia clínica. Os manuais de referência CLSI e BrCAST preconizam diferentes pontos de corte clínico, diferentes critérios de triagem para seleção de amostras que devem ser confirmadas quanto a produção de carbapenemase e ainda, indicam diferentes métodos fenotípicos confirmatórios para essa finalidade. Assim, essas divergências podem resultar em diferentes classificações dependendo do manual adotado. Além disso, os atuais pontos de corte

clínico estabelecidos pelos manuais de referência e os métodos fenotípicos confirmatórios propostos não são capazes de detectar todos os isolados produtores de carbapenemases e ademais, no Brasil não há um manual oficial padronizado para direcionar a aplicação desses métodos de detecção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS)

De acordo com a Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998, a Infecção Hospitalar é definida como toda aquela adquirida após a admissão do paciente em um hospital, podendo se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que relacionado à permanência do paciente na instituição ou a procedimentos hospitalares. Além disso, são consideradas infecções hospitalares as que se manifestam antes de 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados durante esse período. Entretanto, nas últimas décadas o termo “infecções hospitalares” tem sido substituído por “infecções relacionadas à assistência em saúde” - IRAS, sendo essa denominação uma ampliação conceitual que abrange infecções adquiridas e associadas a algum procedimento assistencial (terapêutico ou diagnóstico) em qualquer ambiente sejam em instituições hospitalares, atendimentos ambulatoriais e em hospital dia ou domiciliar (JUNIOR et al., 2014).

Segundo a OMS, a maior prevalência de IRAS ocorre em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), enfermarias cirúrgicas e alas de ortopedia. De acordo com o CDC, o número anual estimado de casos de IRAS nos EUA é de 1.7 milhões, com registro de aproximadamente 100.000 mil óbitos/ano. Nesse contexto, é importante destacar que além das taxas significativas de mortalidade, há enormes perdas financeiras para os sistemas de saúde, uma vez que os custos médicos anuais com cuidados associados às IRAS para os hospitais americanos variam de U\$ 28.4 a U\$ 45 bilhões dólares (SCOTT II, 2009). Apesar dos dados brasileiros de ocorrência de IRAS serem pouco documentados estima-se que 5% a 15% dos pacientes hospitalizados e 25% a 35% dos pacientes admitidos em UTI adquiram algum tipo de IRAS sendo, em geral, a quarta causa de mortalidade (OLIVEIRA et al., 2012). Os dados de 2015 publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) referentes às UTIs de 2.036 hospitais evidenciaram a densidade de incidência de Infecção Primária da Corrente Sanguínea Laboratorial (IPCSL) em UTI adulto, como sendo de 4,8 infecções a cada 1.000 cateter venoso central (CVC)-dia. Em pacientes pediátricos essa incidência foi de 5,7 infecções a cada 1.000 CVC-dia. Na UTI Neonatal, a densidade variou de 6,8 a 8,6 infecções a cada 1.000 CVC-dia (Anvisa, 2016).

Desde 2001, a OMS chama a atenção para um problema mundial: a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos, especialmente para as IRAS. Este é um

tema de extrema relevância no contexto da vigilância e monitoramento das IRAS e consiste em um dos mais preocupantes problemas de saúde da atualidade, uma vez que infecções causadas por bactérias MDR tem se tornado cada vez mais comuns. Em 2015, a OMS publicou um Plano de Ação Global em Resistência Microbiana cujo objetivo geral é assegurar a continuidade da capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas utilizando medicamentos eficazes, seguros e com qualidade comprovada, usados de forma responsável, e que sejam acessíveis a todos os que deles necessitam. Para alcançar esse objetivo, o Plano de Ação Global estabeleceu cinco objetivos estratégicos: 1) melhorar a consciência e a compreensão da resistência antimicrobiana; 2) fortalecer o conhecimento através da vigilância e investigação; 3) reduzir a incidência de infecção através de saneamento eficaz, higiene e medidas de prevenção de infecção; 4) otimizar a utilização de agentes antimicrobianos na saúde humana e animal; e 5) garantir o investimento sustentável em novos medicamentos, diagnósticos, vacinas e outras intervenções para as necessidades de todos os países (Anvisa, 2016; OMS, 2015).

Em vista ao cenário exposto, medidas para prevenção e controle de IRAS devem ser adotadas em todos os estabelecimentos de assistência à saúde, tanto no âmbito hospitalar como no âmbito ambulatorial ou na assistência domiciliar. Pesquisas mostraram que, quando os estabelecimentos de assistência à saúde e suas equipes conhecem a magnitude do problema das infecções e passam a aderir aos programas para prevenção e controle de IRAS, redução de até 70% pode ocorrer para algumas delas, como por exemplo, para as infecções da corrente sanguínea. Com o objetivo de sustentar e estender os programas de vigilância para prevenção de IRAS é vital haver comprometimento entre os órgãos de saúde local, estadual e federal. A vigilância dos dados epidemiológicos referentes à incidência de IRAS, de microrganismos MDR e o monitoramento do surgimento de novos mecanismos de resistência são etapas críticas para o norteameto de estratégias de prevenção e controle, bem como, para o acompanhamento da efetividade das intervenções de saúde pública e detecção de novos padrões e tendências, e para o fortalecimento e qualificação dos laboratórios de microbiologia, visando melhoria da qualidade e segurança dos serviços de saúde no Brasil (Anvisa, 2016; CDC, 2016).

2.2 Infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos

Os especialistas do CDC em conjunto com os do *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) desenvolveram conceitos com o intuito de padronizar a terminologia para descrever o perfil de resistência adquirida em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., bactérias responsáveis pela maior parte das IRAS e propensas a apresentarem mecanismos de resistência a um número significativo de antimicrobianos de uso terapêutico. Para unificar a nomenclatura, foram listados os antimicrobianos clinicamente relevantes para cada espécie, que devem ser avaliados o perfil de susceptibilidade. A resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR) foi definida como a não susceptibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos. Extremamente resistente aos antimicrobianos (XDR) foi definida como a não susceptibilidade a pelo menos um agente de todas as classes de antimicrobianos exceto duas ou menos, ou seja, a cepa bacteriana XDR é susceptível a apenas uma ou duas classes. Pan resistente aos antimicrobianos (PDR) foi definida como não susceptível a todos os agentes em todas as classes de antimicrobianos, isto é, nenhum agente antimicrobiano testado é susceptível para aquele microrganismo. Bactérias PDR carregam o maior tipo de resistência antimicrobiana possível, e como consequência, observamos que não há antimicrobiano disponível com atividade contra essas cepas. Vale destacar, que todos isolados classificados como XDR são também MDR, da mesma forma que um isolado bacteriano PDR é XDR. A Figura 1 ilustra a relação entre MDR, XDR e PDR (MAGIORAKOS et al., 2012).

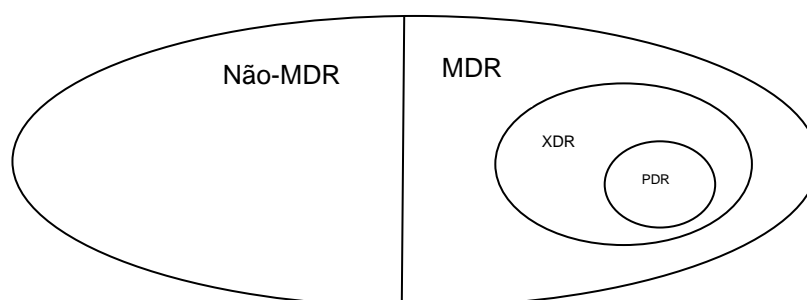


Figura 1 - Diagrama representando a relação entre MDR, XDR e PDR.
Fonte: Adaptado de Magiorakos et al, 2012.

Atualmente a emergência da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas é uma das mais sérias ameaças à saúde pública, uma vez que, assim restam poucos ou até mesmo nenhum antimicrobiano efetivo disponível

para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias. Nos EUA pelo menos 2 milhões de pessoas por ano adquirem infecções causadas por bactérias que são resistentes aos antimicrobianos e estima-se que 23.000 pessoas morrem como resultado direto dessas infecções (CDC, 2013).

As infecções causadas por bactérias MDR atualmente são comuns uma vez que bactérias carreando novos mecanismos de resistência são capazes de atravessar facilmente as barreiras internacionais e disseminar rapidamente entre os continentes. Com a perda da efetividade dos antimicrobianos, torna-se extremamente complicado combater as doenças infecciosas e gerir suas complicações, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como os que estão realizando quimioterapia para câncer, diálise, e foram submetidos a algum procedimento cirúrgico, onde nesses casos a habilidade de tratar infecções secundárias é crucial. Quando o uso dos antimicrobianos de primeira linha e de segunda linha como opção terapêutica é limitado devido à existência dos mecanismos de resistência, os médicos são forçados a utilizar antimicrobianos que podem ser potencialmente mais tóxicos para o paciente e muitas vezes, mais caros e menos efetivos (CDC, 2013; MAGIORAKOS et al., 2012).

O problema do aumento da resistência aos antimicrobianos é ainda mais preocupante, quando é considerado o número limitado de novos agentes antimicrobianos que estão sendo desenvolvidos, assim, o tratamento de infecções causadas por microrganismos MDR, XDR e PDR representa um desafio para muitos hospitais (CDC, 2013; MAGIORAKOS et al., 2012). As infecções causadas por bactérias MDR oneram financeiramente o sistema de saúde e podem levar a falha terapêutica e atraso no tratamento antimicrobiano adequado. Além disso, pacientes com essas infecções possuem maior taxa de mortalidade quando comparados aos pacientes que são infectados pelas cepas não-MDR (BULIK et al., 2010; JEAN et al., 2013; MAGIORAKOS et al., 2012).

O uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais responsáveis por esse cenário, uma vez que, exerce uma enorme pressão seletiva para a manutenção e ampliação da resistência bacteriana. Essa pressão seletiva é caracterizada pela destruição das cepas susceptíveis e sobrevivência das resistentes (Figura 2). Outra situação que favorece a promoção da resistência aos antimicrobianos são as prescrições inadequadas desses agentes. Estudos mostram que a indicação do tratamento, escolha do agente antimicrobiano e a duração da antibioticoterapia são incorretas em 30% a 50% dos casos. Sendo que, de 30% a 60% dos antimicrobianos

prescritos em UTIs foram considerados desnecessários ou inapropriados. Outro fator que favorece o aumento da resistência é o uso dessa classe de medicamento fora da área da saúde. Estima-se que 80% dos antimicrobianos vendidos nos EUA são utilizados em animais para promover o crescimento e prevenir infecções (MARSTON et al., 2016; VENTOLA, 2015).

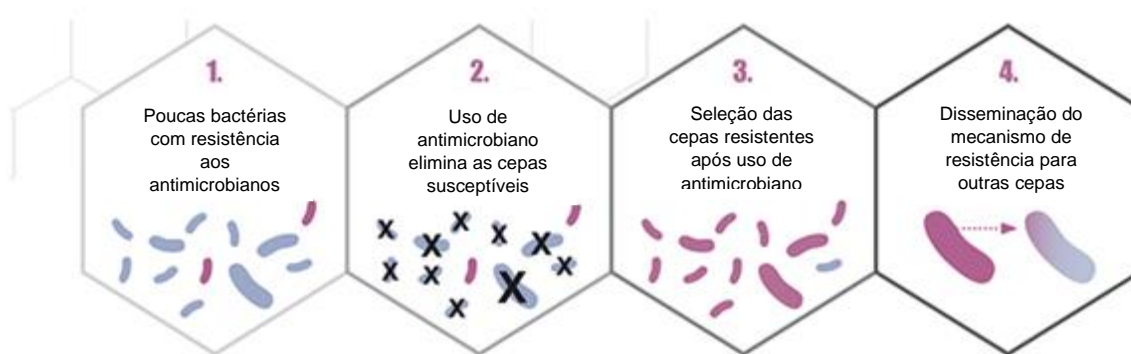


Figura 2 - Mecanismo de resistência aos antimicrobianos através da pressão seletiva.
Fonte: Adaptado de CDC, 2013.

Entre os cocos Gram-positivos (CGPs) MDR, uma pandemia global de *S. aureus* e espécies de *Enterococcus* são as maiores ameaças dos dias atuais. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é responsável por mais mortes entre os americanos do que HIV/AIDS, doença de *Parkinson* e enfisema. Enterococos resistente à Vancomicina (VRE) e um número crescente de outros patógenos estão desenvolvendo resistência aos antimicrobianos mais comuns. Entretanto, os BGNs MDR são os mais preocupantes, pois concentram um número significativo de cepas XDR e PDR. Os BGNs MDR mais frequentes nas infecções graves são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (MAGIORAKOS et al., 2012; CDC, 2013; VENTOLA, 2015). Inclusive, em 2013 o CDC publicou um alerta listando as maiores ameaças devido à resistência aos antimicrobianos e as categorizou baseado no nível de perigo considerando sete fatores: impacto clínico, impacto econômico, incidência, projeção da incidência em 10 anos, transmissibilidade, disponibilidade de antimicrobianos efetivos e barreiras para prevenção. Assim, a classificação se dividiu em: ameaças urgentes, sérias ou preocupantes. Nesse contexto, *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi classificada como ameaça urgente, pois as infecções causadas por esse grupo são difíceis de tratar devido as cepas resistentes a quase e/ou todos antimicrobianos disponíveis no mercado. Além disso, essas bactérias possuem alto potencial de disseminação e

requer atenção urgente da saúde pública para identificar quando esse mecanismo de resistência está envolvido para prevenir e limitar sua transmissão. De acordo com os dados americanos, são registradas 7.900 infecções/ano causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Enquanto isso, *Acinetobacter* spp. MDR e *P. aeruginosa* MDR foram classificados como ameaças sérias, pois são ameaças significativas para a saúde pública e devem ser monitoradas e prevenidas para não agravarem e se tornarem ameaças urgentes. Estas bactérias são responsáveis por 7.300 e 6.700 infecções/ano, respectivamente (CDC, 2013; MARSTON et al., 2016).

No cenário brasileiro, os dados obtidos através de 22.499 notificações feitas pelas Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIHs) de 2.036 hospitais de todo país no ano de 2015 indicaram que o microrganismo mais notificado como agente etiológico das infecções da corrente sanguínea em UTIs adulto foi *K. pneumoniae* (16,9% n=3.805) seguido de *Staphylococcus* Coagulase Negativo (16,5% n=3.703) e *S. aureus* (13,2% n=2.959). Entre os BGNs foram observadas altas taxas de resistência aos carbapenêmicos: nos BGNs não fermentadores, a resistência aos carbapenêmicos foi reportada em 77,4% em *Acinetobacter* spp. e de 39,1% em *P. aeruginosa*, enquanto isso, nos BGNs pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as taxas de resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de amplo espectro (terceira ou quarta gerações) foram de 43,3% para *K. pneumoniae*, 21,6% para *Enterobacter* spp e 9,7% para *Escherichia coli* (Anvisa, 2016).

2.3 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* spp. é composto de bacilos Gram-negativos, imóveis, anaeróbios facultativos e membros da família *Enterobacteriaceae* (OPLUSTIL et al., 2010). A classificação taxonômica atual do gênero é baseada na utilização de diversos substratos, provas bioquímicas, atividade enzimática e ferramentas moleculares. Assim, as espécies que fazem parte do gênero *Klebsiella* são *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella quasipneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* com suas subespécies *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014; MARTÍNEZ et al., 2004; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

K. pneumoniae é a espécie de maior relevância clínica dentro do gênero pois desempenha um papel importante como agente causador de IRAS (Anvisa, 2016; CDC, 2013). A morfologia dos isolados de *K. pneumoniae* é de colônias grandes e

mucóides quando cultivamos em ágar sangue, em placas de ágar MacConkey apresentam-se em grandes colônias com pigmento rosa, devido a fermentação da lactose e produção de ácido. Em relação às provas bioquímicas, são observadas reações de oxidase negativa, produção de indol e motilidade negativos, hidrólise da uréia, descarboxilação da lisina e utilização do citrato positivos, fermentação de glicose, lactose e/ou sacarose e produção de gás (CO₂) (OPLUSTIL et al., 2010). Cepas desta espécie podem ser encontradas em diversos nichos ambientais (solo, água, plantas, etc.), em humanos e outros mamíferos atuando como saprofíticos ao colonizar o trato gastrointestinal, a pele e a mucosa da nasofaringe (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; TZOUVELEKIS et al., 2012).

No passado, esse microrganismo era relacionado principalmente como agente causador de pneumonia adquirida na comunidade, incluindo as formas mais graves da doença. Hoje, apesar da incidência desse agravo ser menor, esse patógeno tornou-se frequente causador de IRAS, sendo responsável por infecções no trato urinário, na corrente sanguínea, no trato respiratório e infecções intra-abdominais. Além disso, nos últimos 20 anos houve muitos relatos de isolados de *K. pneumoniae* responsáveis por uma nova síndrome invasiva que causa abscesso no fígado (HIGHSMITH; JARVIS, 1985; KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007; KO et al., 2002; TSAI et al., 2013; TZOUVELEKIS et al., 2012).

A patogenicidade da espécie está relacionada a numerosos fatores de virulência como: 1) Presença de adesinas – existem cerca de cinco antígenos somáticos descritos que são projeções filamentosas presentes na superfície da célula bacteriana responsáveis pela adesão à mucosa do hospedeiro e fator crucial para o microrganismo ser capaz de evadir os mecanismos de defesa imunológica e causar a infecção. 2) Presença de cápsula – protege a bactéria da fagocitose e morte intracelular pelos neutrófilos, potencializando sua capacidade de invasão. Atualmente são conhecidos cerca de 80 diferentes antígenos capsulares. 3) Lipopolissacarídeo (LPS) – endotoxina presente na membrana externa bacteriana, induz resposta inflamatória no hospedeiro. 4) Secreção de Aerobactina – sideróforo que garante a aquisição de ferro (nutriente essencial para o metabolismo bacteriano). 5) Resistência a agentes antimicrobianos mediadas por enzimas localizadas em plasmídeos transferíveis entre espécies, gêneros e até famílias diferentes (HIGHSMITH; JARVIS, 1985; TSAI et al., 2013).

2.4 Resistência aos antimicrobianos terapêuticos em *K. pneumoniae*

A resistência aos antimicrobianos mediada pelas bactérias pode ocorrer de forma intrínseca ou adquirida através da transmissão de material genético ou mutação. A resistência intrínseca é definida como aquela resultante do estado fisiológico do microrganismo ou de sua organização estrutural. Tal resistência é transferida da célula mãe para a célula filha na replicação garantindo assim, sua presença nos isolados que compõe um grupo, um gênero ou uma espécie em particular. Esse tipo de resistência é causada pela ausência do alvo metabólico de interação com o antimicrobiano, existência de enzimas que apresentem a capacidade de inativar o antimicrobiano e/ou a presença de características inerentes à morfologia bacteriana que impedem o acesso do antimicrobiano ao seu alvo. Um exemplo de resistência intrínseca inerente à *K. pneumoniae*, é a resistência à amoxicilina, ampicilina e ticarcilina, devido a produção de β -lactamases cromossomais que inativam esses antimicrobianos. A resistência adquirida, por sua vez, pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos. No caso da resistência adquirida, os genes de resistência aos antimicrobianos podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. Estes são os mais frequentes carreadores e responsáveis pela transferência horizontal entre os isolados bacterianos, inclusive de gêneros distintos, levando a rápida disseminação da resistência na população microbiana (BLAIR et al., 2015; GIEDRAITIENĖ et al., 2011; VERMELHO, BASTOS, SÁ, 2008).

Com o uso abusivo dos agentes antimicrobianos, os mecanismos de resistência tornaram-se comuns, principalmente nos ambientes hospitalares. Esses mecanismos podem ser observados na Figura 3 e incluem: 1) perna de porinas, que reduz a entrada do antimicrobiano através da membrana celular; 2) presença de β -lactamases no espaço periplasmático, que é responsável por degradar os antimicrobianos β -lactâmicos; 3) aumento da expressão de bombas de efluxo, que bombeiam o antimicrobiano para fora da célula bacteriana antes que o mesmo tenha efeito; 4) presença de enzimas modificadoras de antimicrobianos, que fazem com que o antimicrobiano seja incapaz de interagir com seu alvo; 5) alteração do sítio alvo, que impede que o antimicrobiano se ligue ao mesmo; 6) mutações ou alterações ribossomais, que impedem o antimicrobiano de se ligar e inibe a síntese proteica; 7) presença de uma segunda enzima que executa a reação metabólica inibida; 8)

mutação no lipopolissacarídeo que impedem que os antimicrobianos da classe das polimixinas se liguem ao seu alvo (BLAIR et al., 2015; PELEG; HOOPER, 2010).

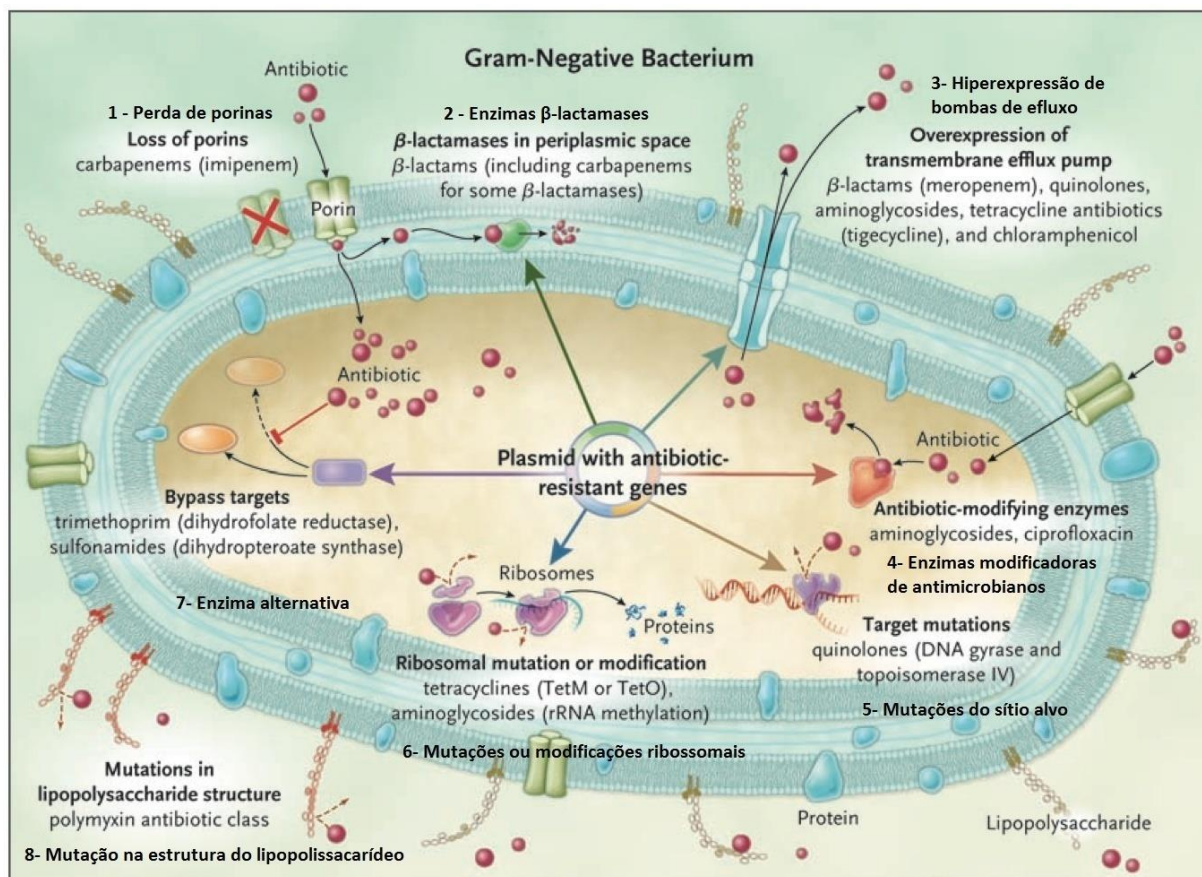


Figura 3 - Mecanismo de resistência aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos.

Fonte: Adaptado de Peleg; Hooper, 2010.

Dentre os mecanismos de resistência adquiridos mais frequentes entre os isolados de *K. pneumoniae*, destacam-se os associados à resistência às fluoroquinolonas, aos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos (VERMELHO, BASTOS, SÁ, 2008).

As fluoroquinolonas inibem a ação da DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a replicação do DNA bacteriano. A resistência a estes antimicrobianos é adquirida por mutações espontâneas em genes cromossômicos, levando a alterações no sítio de ação (topoisomerasas). Além disso, pode estar relacionado com os outros mecanismos de resistência, como: alteração de permeabilidade e hiperexpressão de bombas de efluxo, resistência mediada por plasmídeos e alteração enzimática da molécula do antimicrobiano (BLAIR et al., 2015; PELEG; HOOPER, 2010; VERMELHO, BASTOS, SÁ, 2008).

A modificação enzimática é o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos. Este tipo de mecanismo pode resultar em alto grau de resistência a estes agentes antimicrobianos. Os genes responsáveis por esta resistência encontram-se geralmente em plasmídeos ou transposons. Atualmente, mais de 50 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos já foram descritas e classificadas como: N-acetiltransferases, O-adeniltransferases e O-fosfotransferases. Os aminoglicosídeos contêm em sua estrutura grupos amino ou hidroxila, os quais podem ser modificados pelas enzimas citadas. Os aminoglicosídeos modificados nestes grupamentos perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo e, conseqüentemente, de inibir a síntese proteica bacteriana. Outros mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos como alteração no sítio de ação (subunidade 30S do RNA ribossomal) e alterações na permeabilidade da membrana celular externa também são descritos (BLAIR et al., 2015; PELEG; HOOPER, 2010; VERMELHO, BASTOS, SÁ, 2008).

Em relação à resistência aos β -lactâmicos, destacam-se a perda de porinas, o aumento da atividade da bomba de efluxo e a produção de β -lactamases, enzimas de grande interesse em *K. pneumoniae* (BLAIR et al., 2015; PELEG; HOOPER, 2010; VERMELHO, BASTOS, SÁ, 2008). Os antimicrobianos β -lactâmicos possuem em comum a presença do anel β -lactâmico em sua estrutura. Os principais representantes dessa classe são as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Essas drogas são amplamente prescritas e estão incluídas em diversos esquemas terapêuticos para tratamento de doenças infecciosas. O principal mecanismo de resistência a essas drogas em *K. pneumoniae* ocorre devido à produção de enzimas β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico presentes na estrutura do antimicrobiano impedindo a sua ação (BUSH; JACOBY, 2010). As β -lactamases cromossômicas são distintas das que são carregadas por plasmídeos, embora seja descrito a mobilização de genes e transmissão horizontal entre espécies de BGNs, como a transferência de genes AmpC cromossômicos de *Citrobacter* spp e *Enterobacter* spp para *K. pneumoniae* e a aquisição de genes ESBLs de bactérias ambientais, como a aquisição de CTX-M em enterobactérias provenientes de *Kluyvera* spp. (LIVERMORE, 1995; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Outro caso descrito foi a transmissão da SHV-1 que é constitutiva em *K. pneumoniae* para outras enterobactérias. Essa transmissão de genes também pode ocorrer entre espécies diferentes, como as enzimas da classe TEM que inicialmente foram descritas em

plasmídeos de enterobactérias e se disseminou para *P. aeruginosa*. Atualmente, a maioria das β -lactamases são carregadas por plasmídeos. Já existem centenas de enzimas descritas, sendo a maioria sequências variante de um tipo prevalente (LIVERMORE, 1995; MARSTON et al., 2016).

Essas enzimas foram classificadas, inicialmente, com base nas suas estruturas moleculares (AMBLER, 1980) e, em características funcionais de acordo com seus substratos e inibidores (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A classificação atualmente utilizada, revisada por Bush e Jacoby (2010), é baseada na associação da classe molecular de Ambler e os grupos de Bush. De acordo com a estrutura molecular as β -lactamases foram divididas em quatro classes (A, B, C e D) e segundo as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes podem ser divididas em dois grupos: serino- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (BUSH; JACOBY, 2010).

No sistema atual (Quadro 1) é observado no grupo 1 (classe C) as cefalosporinases, também conhecidas como AmpC, que são capazes de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas até a terceira geração e não são inibidos pelos inibidores de β -lactamases ácido clavulânico (CA) e tazobactam (TZB). O grupo 2 (classes A e D) é dividido em 12 subgrupos que englobam penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e carbapenemases, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de espectro estendido e carbapenêmicos, respectivamente. Essas enzimas são resistentes aos inibidores de β -lactamases CA e TZB. O subgrupo 2a contém apenas penicilinas e são predominantes entre os CGPs, enquanto no 2b estão as primeiras β -lactamases descritas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1). Porém, devido ao grande número de variantes descritos nos anos subsequentes houve a necessidade da criação de novos subgrupos, segregados do subgrupo 2b. Trata-se atualmente dos 2be e 2br. No subgrupo 2be, a letra “e” significa amplo espectro de atividade e representa as β -lactamases capazes de inativar as cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima) e o aztreonam. No subgrupo 2br são encontradas as ESBLs resistentes aos inibidores de β -lactamases. No subgrupo 2e estão as cefalosporinases que podem também hidrolisar os monobactâmicos e são resistentes aos inibidores de β -lactamases. As carbapenemases incluem enzimas dos subgrupos 2df (classe D, enzimas OXA), 2f (classe A, serino carbapenemases) e 3a/3b (classe B, metalo- β -lactamases) (BUSH; JACOBY, 2010).

Um estudo brasileiro sobre a diversidade de ESBLs no país demonstrou que os tipos mais prevalentes entre os isolados de *K. pneumoniae* são as CTX-M, SHV e TEM, sendo a CTX-M-2 a enzima mais detectada nesta espécie (SAMPAIO; GALES, 2016).

Quadro 1 - Classificação das β -lactamases de acordo com Bush e Jacoby, 2010.

β -lactamases							
Bush-Jacoby grupo (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros grupo (1995)	Classe molecular	Substrato	Inibidas por		Características	Representantes
				CA ou TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas que benzilpenicilina; hidrolizam cefamicinas	E. coli AmpC, MIR-1, ACT-1, FOX-1, GC1, CMY-37, CMY-2, P99
1e	NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise de ceftazidime e muitos outros oximino- β -lactamase	GCI, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	penicilinas, cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similares de benzilpenicilina e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Sim	Não	Hidrolisa oximino- β -lactamase (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTXM-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Não	Não	Hidrolisa oximino- β -lactamase combinado com resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrolisa a carbenicilina	PSE, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Hidrolisa carbenicilina, cefepime e cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variavel	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas espectro estendido	Variavel	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactamase	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenens	Variavel	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenens	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas espectro estendido	Sim	Não	Hidrolisa cefalosporinas, inibidas pelo ácido clavulânico mas não aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenens	Variavel	Não	Hidrolisa carbapenens, oximino- β -lactamase, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenens mas não monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1

Fonte: Adaptado de Bush e Jacoby, 2010.

2.5 *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

Em *K. pneumoniae* as β -lactamases mais frequentes e de maior impacto clínico são as ESBLs e as carbapenemases. As ESBLs são capazes de hidrolisar antimicrobianos do grupo das penicilinas e cefalosporinas, inclusive as de 3ª a 4ª geração. Já as carbapenemases são as mais preocupantes visto que são capazes de hidrolisar praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Vale ressaltar que os genes *bla*_{KPC} são carregados por plasmídeos e podem ser transferidos junto com genes que codificam vários tipos de ESBL. Esses plasmídeos em geral também carregam determinantes de resistência a outros antimicrobianos como os da classe das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; PETRELLA et al., 2008).

As carbapenemases da classe B hidrolisam todos antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam. Essas enzimas não são inibidas pelos CA e TZB, entretanto, têm sua atividade inibida pelo EDTA. As principais enzimas reportadas nessa classe são a VIM, IPM e NDM. Entre elas, a NDM é a de maior importância clínica entre os isolados de *K. pneumoniae* (LEE et al., 2016; NORDMANN, 2013). Esta enzima foi detectada pela 1ª vez no ano de 2008 em um paciente hospitalizado na Suíça que havia retornado de Nova Deli (Índia) e deste então se disseminou mundialmente. Em 2010 isolados produtores de NDM já haviam sido reportados em todos continentes, com exceção da América Central e América do Sul (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Atualmente existem 16 variantes de NDM descritas (<http://www.lahey.org/STUDIES/other.asp#table1>), a maioria proveniente do subcontinente Indiano, onde *K. pneumoniae* produtora de NDM é considerada endêmica, sendo a carbapenemase mais detectada entre os isolados produtores de carbapenemase (LEE et al., 2016). Na América do Sul, os primeiros relatos de cepas produtoras de NDM foram na Colômbia (2011), Uruguai (2012) e no Brasil (2013), onde foram identificadas cepas de *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae* produtoras de NDM na cidade de Porto Alegre, nesse mesmo ano foi reportado pacientes colonizados com NDM no Rio de Janeiro (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014). Apesar de ocorrer em forma de casos esporádicos, existem medidas preconizadas pela Anvisa (2013) com o objetivo de detectar esses isolados para assim, prevenir e controlar sua disseminação no país.

As carbapenemase da classe D são denominadas de oxacilinasas (OXAs) por hidrolisar a oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e carbapenêmicos (KARAMPATAKIS et al., 2016; LEE et al., 2016; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Essas enzimas recentemente foram reclassificadas em 12 subgrupos: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229 e OXA-235. Dentre elas, apenas as OXA-23, OXA-48, OXA-51 e OXA-58 são reportadas em *K. pneumoniae*, sendo a OXA-48 a de maior importância clínica (LEE et al., 2016). O primeiro produtor de OXA-48 identificado foi em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2003 e desde então essa enzima se tornou endêmica no país, sendo responsável por diversos surtos hospitalares. Atualmente, encontra-se amplamente distribuída entre os países europeus, Marrocos, Tunísia, Líbia, Egito e Índia (KARAMPATAKIS et al., 2016; LEE et al., 2016). Na América do Sul são

reportados casos esporádicos em países como Argentina e Brasil (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014).

As serino carbapenemases da classe A hidrolisam todos antimicrobianos β -lactâmicos e são inibidas pelo CA e TZB (BUSH; JACOBY, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007). Enquanto algumas dessas carbapenemases são cromossômicas (IMI-1, NMC e SME), outras são carregadas por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (KPC, GES, IMI-2) (LEE et al., 2016). Desde sua descoberta na Carolina do Norte em 1996, as enzimas KPC são as mais frequentes dentro dessa classe de carbapenemases e a que possui maior impacto clínico. *K. pneumoniae* é a principal espécie relacionada como produtora e responsável por sua rápida disseminação mundial (LEE et al., 2016; MUNOZ-PRICE et al., 2013; NORDMANN, 2013). Atualmente, existem 23 variantes descritas (<http://www.lahey.org/STUDIES/other.asp#table1>), sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais caracterizadas e reportadas (LEE et al., 2016; NORDMANN, 2013). No Brasil a KPC-2 é a única variante circulante (SAMPAIO; GALES, 2016). O primeiro relato de *K. pneumoniae* na América do Sul ocorreu em 2005 na Argentina, no ano seguinte houve o primeiro caso no Brasil na cidade do Recife (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014). Atualmente, a disseminação desse gene pode ser observada em todas as regiões do Brasil e encontra-se em expansão, a prevalência dessas cepas ocorre de forma endêmica no país, como pode ser observado na Figura 4 (LEE et al., 2016; MUNOZ-PRICE et al., 2013; SAMPAIO; GALES, 2016). Um estudo publicado recentemente analisou 3.085 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de 10 hospitais de São Paulo no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2015. O estudo mostrou um aumento nas taxas de resistência aos carbapenêmicos de 6,8% (2011) para 35,5% (2015), sendo que no último ano do estudo o gene *bla_{KPC}* foi detectado em 96,2% das amostras de *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos (BARTOLLETTI et al., 2016).

Com base no cenário exposto, é essencial a rápida detecção de cepas produtoras de carbapenemase com o objetivo de implementar medidas de prevenção e controle para minimizar o risco de disseminação desses isolados. Entretanto, a detecção de carbapenemase em isolados clínicos representa um desafio para os laboratórios de microbiologia, uma vez que nem sempre esses isolados apresentam resistência aos carbapenêmicos nos testes de susceptibilidade empregados. Os estudos mostram que a expressão da enzima KPC em *K. pneumoniae* é variável e o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos pode estar associado a outros

mecanismos como a produção de ESBLs ou produção de enzimas AmpC combinada com diminuição de permeabilidade da droga devido à perda de porina. (QUEENAN, BARTOLINI, HAMMOUDI, NORDMANN 2011, MUNOZ PRICE, NOORDMANN 2009).

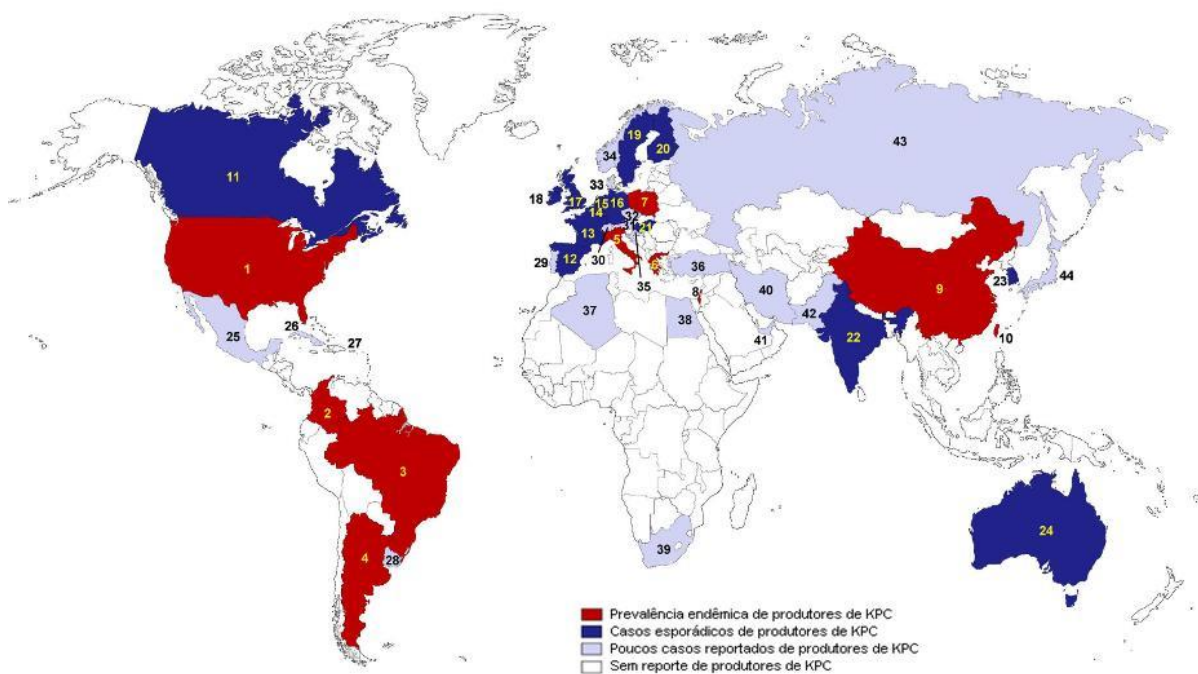


Figura 4 - Distribuição mundial de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC. (1) EUA (2) Colômbia (3) Brasil (4) Argentina (5) Itália (6) Grécia (7) Polônia (8) Israel (9) China (10) Taiwan (11) Canadá (12) Espanha (13) França (14) Bélgica (15) Holanda (16) Alemanha (17) Inglaterra (18) Irlanda (19) Suécia (20) Finlândia (21) Hungria (22) Índia (23) Coreia do Sul (24) Austrália (25) México (26) Cuba (27) Porto Rico (28) Uruguai (29) Portugal (30) Suíça (31) Áustria (32) República Checa (33) Dinamarca (34) Noruega (35) Croácia (36) Turquia (37) Argélia (38) Egito (39) África do Sul (40) Irã (41) Emirados Árabe (42) Paquistão (43) Rússia (44) Japão.

Fonte: Lee et al., 2016.

2.6 Detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

Os manuais de avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos preconizam a utilização do método de DD e a determinação da CMI por métodos como o de microdiluição em caldo ou a técnica de gradiente em escala para carbapenêmicos. Dentre os carbapenêmicos, o ertapenem (ERT) é relatado como melhor candidato para detecção da maioria dos produtores de carbapenemase, uma vez que a CMI deste antimicrobiano é frequentemente maior que a dos outros carbapenêmicos. Entretanto, o ERT pode apresentar fenótipo de resistência entre cepas não produtoras de carbapenemase, mas que produzem AmpC ou ESBL associados a outros mecanismos de resistência, como à perda de porinas e bombas de efluxo. Assim, os manuais indicam que estes métodos devem ser usados como triagem na seleção de

amostras que deverão ser avaliadas por outros métodos fenotípicos ou genotípicos considerados confirmatórios para produção de carbapenemase ou presença do gene de carbapenemase, respectivamente. A pesquisa desse mecanismo de resistência é recomendada para todas as amostras de enterobactérias que apresentam sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos, uma vez que, como exposto anteriormente, o fenótipo de susceptibilidade aos carbapenêmicos pode ser observado em isolados que albergam o gene *bla_{KPC}* (BARTOLINI et al., 2014; BIRGY et al., 2012; BOYLE; ZEMBOWER, 2015; MUNOZ-PRICE et al., 2013).

O método padrão ouro para detecção de produtores de carbapenemase é baseado em técnicas moleculares, principalmente os métodos de amplificação de DNA, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Esta técnica é capaz de fornecer resultados rápidos (4 a 6 horas) com alta sensibilidade e especificidade. O emprego de métodos moleculares é eficaz para eliminar os problemas dos métodos fenotípicos, como a detecção da carbapenemase do tipo OXA, que não é detectável pela maioria dos testes fenotípicos. A PCR Multiplex e a PCR em tempo real permitem a identificação de múltiplos genes de carbapenemase e têm sido utilizados com sucesso em muitos estudos. Atualmente, existem muitas publicações com os *primers* e condições dos ciclos dos genes de carbapenemase clinicamente relevantes. Os testes genotípicos são os mais seguros e eficazes para detecção dos genes de carbapenemase, no entanto, requerem reagentes e equipamentos de custo elevado e profissionais altamente treinados e capacitados. Os investimentos para implementar e manter esses métodos são altos e a maioria dos laboratórios de diagnóstico clínico não tem condições no momento de utilizá-los, por isso, eles são mais frequentes em laboratórios de referência (BARTOLINI et al., 2014; HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; NORDMANN et al., 2012; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Uma alternativa viável para os laboratórios de microbiologia detectarem isolados produtores de carbapenemases em amostras clínicas quando os métodos moleculares não estão disponíveis é através dos métodos fenotípicos. No entanto, nenhum dos testes atualmente disponíveis apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Os métodos atualmente recomendados pelos manuais de referência CLSI e BrCAST são o Teste de Hodge Modificado (MHT), o teste de sinergismo com inibidores e o teste CarbaNP (HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS,

2014; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; NORDMANN et al., 2012; ZAHEDI BIALVAEI et al., 2016).

O MHT é recomendado pelo CLSI como teste confirmatório de produção de carbapenemase para os membros da família *Enterobacteriaceae*. O teste consiste em verificar a produção de carbapenemase através da observação de crescimento de uma cepa controle sensível aos carbapenêmicos (*Escherichia coli* ATCC 25922) próximo a sementeira de uma amostra produtora de carbapenemase. O MHT é uma técnica de baixo custo e possui alta sensibilidade (>90%) na detecção de carbapenemase da classe A (KPC) e classe D (OXA-48) em isolados da família *Enterobacteriaceae*. Porém, para detecção de carbapenemases da classe B (NDM) a sensibilidade é baixa (50%). Atualmente, estudos mostram que a adição de zinco no Ágar Mueller Hinton (MH) pode aumentar sensibilidade em detectar as enzimas NDM. Uma limitação atribuída ao método é o fato dele não ser capaz de distinguir o tipo de carbapenemase envolvida e, mais importante, são observados resultados falso-positivos com isolados produtores de ESBL do tipo CTX-M ou aumento de β -lactamase AmpC (cefalosporinases). O MHT é uma ferramenta eficaz para detectar a enzima KPC em hospitais onde essa enzima é prevalente, no entanto, como o teste não diferencia as carbapenemases seu valor preditivo positivo para detecção de KPC é baixo nas regiões onde outras carbapenemases, como a NDM, estão presentes (HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; NORDMANN et al., 2012; ZAHEDI BIALVAEI et al., 2016).

No manual de detecção de mecanismos de resistência aos carbapenêmicos preconizados pelo BrCAST (2015) é indicado o uso do teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases como método confirmatório. É uma técnica simples de se realizar e interpretar, bem validada pelos estudos e aplicável para uso rotineiro em laboratórios de microbiologia clínica. O teste compara a atividade do carbapenêmico com o sem a presença de inibidores que são específicos para determinada enzima carbapenemase. Assim, na presença desses inibidores, a atividade enzimática diminui e por isso, os isolados que produzem carbapenemases se tornam mais sensíveis aos β -lactâmicos resultando na observação do aumento do halo de inibição do carbapenêmico suplementado com o inibidor comparado ao halo do carbapenêmico sozinho. Os principais inibidores utilizados são: os derivados do ácido borônico (inibidor de KPC e AmpC), EDTA ou ácido dipicolínico (inibidores de M β L) e cloxacilina (inibidor de AmpC). Recentemente, discos de temocilina foram recomendados como

adicional ao teste para detecção de carbapenemases OXA-48, no entanto, esses discos não são comercializados no Brasil, assim, em nosso país, não há nenhum inibidor disponível para detectar essas carbapenemases. O teste de sinergismo com os inibidores específicos possui alta sensibilidade e especificidade e, além disso, através da interpretação do resultado utilizando o algoritmo do BrCAST (Figura 5) é possível distinguir a classe enzimática envolvida ou se o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é causado por outros fatores, como a produção de ESBL com perda de porina e/ou hiperexpressão de enzimas AmpC (HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; NORDMANN et al., 2012; ZAHEDI BIALVAEI et al., 2016).

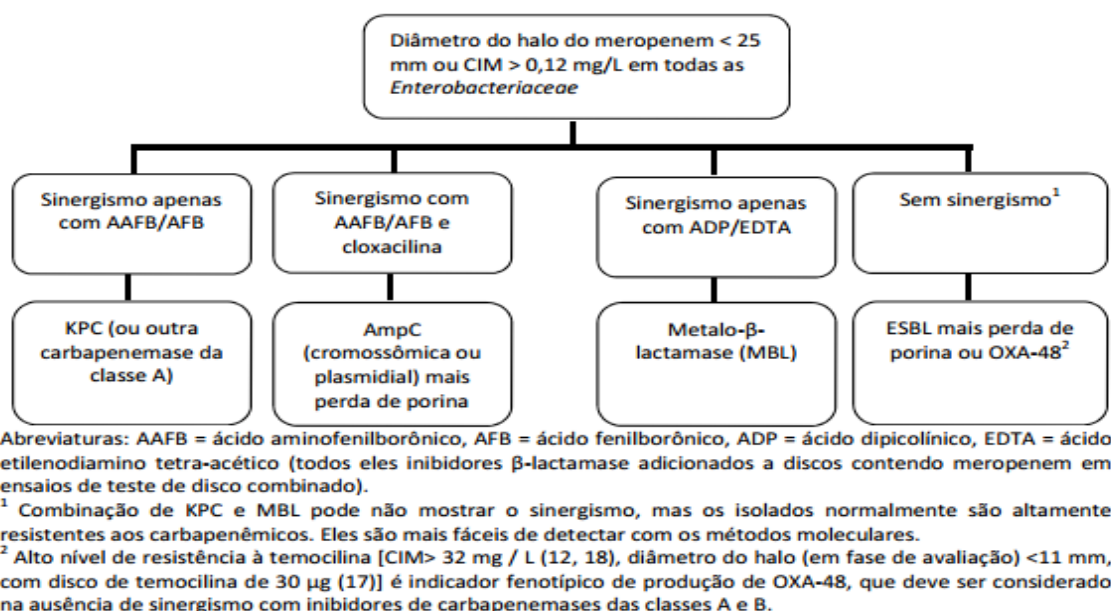


Figura 5 - Algoritmo para detecção de carbapenemases.
Fonte: BrCAST, 2015.

O CarbaNP é uma opção de método confirmatório presente em ambos manuais de referência. O princípio deste método bioquímico de detecção é que a hidrólise do imipenem (IPM) leva a alteração de pH que resulta em mudança da cor do indicador de vermelho para amarelo. O teste diferencia os isolados produtores de carbapenemase dos isolados que apresentam resistência aos carbapenêmicos por outros mecanismos. É um método rápido (menos de 2 horas) e possui sensibilidade alta para grande parte das carbapenemases (73% a 100%). Porém, o teste não é capaz de distinguir a classe da enzima e não detecta carbapenemase GES, o que seria uma grande limitação em regiões onde essa enzima é prevalente. Além disso,

resultados falso-negativos são relatados em cepas que estão expressando carbapenemase em baixos níveis, especialmente isolados produtores de OXA-48. Apesar de ser descrito na literatura como um método barato, essa realidade não é aplicável ao mercado brasileiro, uma vez que a importação do método resulta em alto custo para o laboratório (HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; LUTGRING; LIMBAGO, 2016; NORDMANN et al., 2012; ZAHEDI BIALVAEI et al., 2016).

No atual cenário brasileiro a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica utilizam os métodos de DD ou determinação da CMI para detecção de amostras com potencial de produção de carbapenemase. Entretanto, nem sempre é empregado algum método fenotípico de confirmação e a confirmação através de métodos de biologia molecular é restrita aos laboratórios de referência em virtude do seu alto custo de implantação e manutenção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar acurácia dos métodos e critérios interpretativos propostos pelos manuais de referência CLSI e BrCAST para detecção da produção de carbapenemase em amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* carreadora do gene *bla_{KPC}*.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil de susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos das amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

Verificar acurácia do ertapenem, imipenem e meropenem na classificação do perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos nas amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

Verificar acurácia dos métodos de difusão do disco e de determinação da CMI para detecção da resistência aos carbapenêmicos nas amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

Verificar acurácia dos métodos fenotípicos Teste de Hodge Modificado e Teste de sinergismo com inibidores para detecção da produção de carbapenemase em amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

Comparar a acurácia obtida entre os métodos e critérios interpretativos propostos pelos manuais de referência CLSI e BrCAST na detecção de produção de carbapenemase em *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Bacterianas

Foram incluídos neste estudo 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de diferentes espécimes clínicos de pacientes atendidos em 16 hospitais da Grande Vitória no ano de 2014 apresentando o gene da carbapenemase do tipo KPC associada a diferentes genes que codificam ESBLs (Tabela 1).

Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-ES) e fazem parte do projeto de pesquisa intitulado “Epidemiologia molecular e investigação dos genes de resistência em bactérias multirresistentes isoladas em hospitais da grande Vitória”. Aprovado no edital FAPES/CNPq/MS-Decit/SESA nº 10/2013 – PPSUS e coordenado pelo Dr. Ricardo Pinto Schuenck.

Tabela 1 - Distribuição dos genes das 47 amostras clínicas de *K. pneumoniae*.

Genes detectados	Distribuição nas amostras
KPC ¹ + TEM ² + SHV ³ + CTX-M ⁴ + OXA-1 ⁵	19 (40,4%)
KPC + TEM + SHV+ CTX-M	18 (38,3%)
KPC + TEM + SHV	03 (6,4%)
KPC + SHV	02 (4,3%)
KPC + TEM + CTX-M	01 (2,1%)
KPC + TEM	01 (2,1%)
KPC + TEM + SHV + OXA-1	01 (2,1%)
KPC + SHV + OXA-1 + CTX-M	01 (2,1%)
KPC + SHV+ CTX-M	01 (2,1%)

¹Variantes KPC 1 a 5, ²Variantes TEM, incluindo TEM-1 e TEM-2, ³Variantes SHV, ⁴Variantes CTX-M, incluindo CTX-M grupo 1, CTX-M grupo 2, CTX-M grupo 8/25, CTX-M grupo 9, ⁵OXA-1-like (OXA-1, OXA-4 e OXA-30).

Fonte: Borghi, 2017.

As amostras foram obtidas a partir dos seguintes espécimes clínicos: urina (27,7% n=13), sangue (25,5% n=12), secreções (21,3% n=10), ponta de cateter (12,8% n=6), aspirado traqueal (8,5% n=4), líquido peritoneal (2,1% n=1) e fragmento ósseo (2,1% n=1).

Como requisito para controle de qualidade dos testes, as seguintes amostras padrão foram utilizadas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensível aos carbapenêmicos), *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 (sensível aos carbapenêmicos), *Klebsiella*

pneumoniae BAA 1705 (resistente aos carbapenêmicos, presença do gene *bla_{KPC}*) e *Kelbsiella pneumoniae* CCBH 15668 (resistente aos carbapenêmicos, presença do gene *bla_{NDM}*).

Todas as cepas bacterianas foram armazenadas em meio TSB com glicerol 20% e estocadas a -20°C.

4.2 Identificação fenotípica

A confirmação da espécie bacteriana foi realizada através da observação da morfologia da colônia em ágar Sangue e ágar MacConkey, avaliação morfotintorial pelo método de Gram e perfil bioquímico pelos testes de oxidase, utilização do citrato Simmons, hidrólise da uréia, motilidade, produção de indol, descarboxilação lisina, fermentação dos carboidratos glicose, sacarose e lactose e produção de H₂S e gás (OPLUSTIL et al., 2010).

4.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a 22 antimicrobianos foi obtido segundo o método de DD de acordo com as instruções do protocolo do BrCAST (2016) para os seguintes antimicrobianos: amicacina 30µg (AMI), amoxicilina-clavulanato 30µg (AMC), ampicilina 10µg (AMP), aztreonam 30µg (ATM), cefazolina 30µg (CFZ), cefepima 30µg (COM), cefotaxima 30µg (CTX), cefoxitina 30µg (CFO), ceftazidima 30µg (CAZ), ciprofloxacina 5µg (CIP), cloranfenicol 30µg (CLO), gentamicina 10µg (GEN), levofloxacina 5µg (LEV), nitrofurantoina 300µg (NIT), norfloxacina 10µg (NOR), ofloxacina 5µg (OFX), piperacilina 30µg (PRL), piperacilina-tazobactam 110µg (PIT), tetraciclina 30µg (TET), ticarcilina-clavulanato 85µg (TAC), tobramicina 10µg (TOB) e trimethoprima-sulfamethoxazole 25µg (SUT).

Para realização do método foi preparada uma suspensão da amostra bacteriana em salina 0,9% com padrão de turvação similar ao da escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* estéril, essa suspensão foi semeada em três direções por toda superfície de uma placa de ágar MH. Os discos de antimicrobianos foram aplicados no máximo 15 minutos após a inoculação da placa. Em seguida, as placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16-20h e os diâmetros dos halos de inibição para cada antibiótico testado foram avaliados. A categorização das amostras em sensível (S), resistente intermediária (RI) ou resistente (R) foi realizada segundo os limites de sensibilidade preconizados pelo BrCAST (2016).

4.4 Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos

4.4.1 Método de difusão do disco

O perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos imipenem 10µg (IPM), meropenem 10µg (MPM) e ertapenem 10µg (ERT) (Sensidisc, DME, São Paulo) foi realizado conforme descrito no item 4.3 e a categorização da susceptibilidade das amostras foi baseada nos manuais CLSI (2016) e BrCAST (2016).

4.4.2 Método de determinação da CMI

A determinação da CMI foi realizada pela técnica de gradiente em escala para: IMP e MPM (M.I.C.E®, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK) e ERT (Etest®, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

O método foi realizado de acordo com as instruções de cada fabricante. Suspensão bacteriana em salina com padrão de turvação similar ao da escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi semeado em placas de ágar MH para a obtenção de crescimento confluyente. As fitas dos antibióticos foram aplicadas em até 15 minutos após a semeadura. A leitura foi realizada após 16-20h de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

A categorização da susceptibilidade das amostras aos carbapenêmicos foi baseada nos manuais CLSI (2016) e BrCAST (2016).

4.5 Métodos fenotípicos conformatórios para produção de carbapenemase

4.5.1 Teste de Hodge Modificado

Este método foi realizado segundo as instruções do CLSI (2016). Foi preparada uma suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 em salina 0,9% com padrão de turvação similar ao da escala 0,5 de McFarland. Esta suspensão foi diluída 1:10 em salina 0,9% e em seguida foi inoculada na superfície de uma placa de ágar MH com auxílio de um *swab*. Após 3 a 10 minutos foi colocado um disco de ERT 10µg no centro da placa. Três a cinco colônias de cada amostra e da cepa *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 (amostra produtora de carbapenemase, controle positivo) foram estriadas com *swab* em sentido único da borda até o centro da placa próximo ao disco de ERT. O mesmo procedimento foi realizado com o disco de MPM. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ de 16 a 20 horas.

A amostra de *K. pneumoniae* foi considerada produtora de carbapenemase quando foi observado crescimento da cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 dentro do halo de inibição formado pelo antibiótico carbapenêmico de forma similar a amostra controle *K. pneumoniae* BAA 1705 segundo a Figura 6.

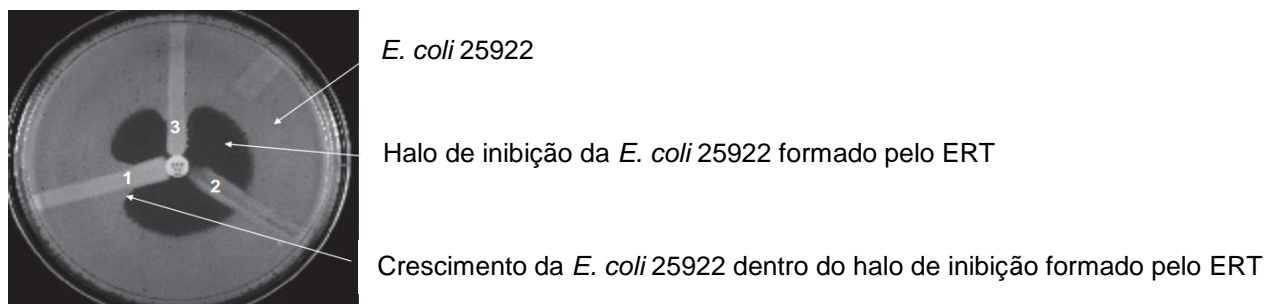


Figura 6 - MHT com ERT em placa de ágar MH 15 x 90mm. 1- *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705, resultado positivo para produção de carbapenemase. 2- *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706, resultado negativo para produção de carbapenemase. 3- Amostra clínica testada, resultado positivo para produção de carbapenemase.

Fonte: Adaptado de CLSI, 2016.

4.5.2 Teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases

O teste de sinergismo com inibidores foi realizado segundo as orientações para detecção de mecanismos de resistência aos carbapenêmicos preconizados pelo BrCAST (2015).

As análises foram realizadas em duplicata com discos de MPM (10 μ g) e ERT (10 μ g) suplementados com um inibidor de β -lactamase da classe A: ácido fenilborônico (PBA) (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), um inibidor de β -lactamase da classe B: EDTA (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) e a cloxacilina (CLOXA) (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany).

Os discos dos carbapenêmicos foram suplementados com 10 μ L de solução de PBA a 40mg/mL, EDTA a 0,1M ou de CLOXA a 75mg/mL. Dessa forma, a concentração final de inibidor em cada disco foi de 400 μ g de PBA, 292 μ g de EDTA e 750 μ g de CLOXA.

Os discos com e sem adição das soluções de inibidores eram do mesmo lote e foram preparados 30 minutos antes da realização do teste. As soluções com os inibidores foram dispensadas nos discos sobre o fundo de uma placa de Petri estéril.

Conforme as instruções do BrCAST, uma suspensão bacteriana em salina 0,9% com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi inoculada sobre a superfície do ágar MH em placa de 15 x 150 mm. Em cada placa foram adicionados quatro discos: MPM 10 μ g, MPM 10 μ g + PBA, MPM 10 μ g + EDTA, MPM

10 µg + CLOXA (Figura 7). A leitura foi realizada após incubação a 18 a 24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando os discos de MPM 10µg e ERT 10µg suplementados com os inibidores.

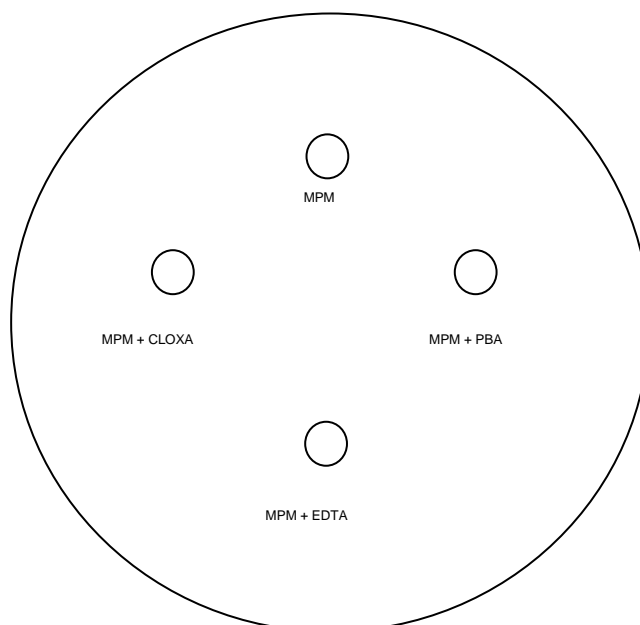


Figura 7- Esquema dos discos de antimicrobianos para detecção de mecanismos de resistência a carbapenêmicos pelo teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases.
Fonte: Adaptado de BrCAST, 2015.

O teste foi considerado positivo quando houve um aumento igual ou maior que 5mm no diâmetro do halo de inibição ao redor do disco do carbapenêmico contendo o inibidor de β -lactamase comparado com o halo de inibição do disco sem adição de inibidores. A interpretação do teste seguiu o algoritmo ilustrado na Figura 5, proposto pelo BrCAST (2015).

As amostras padrão *K. pneumoniae* BAA 1705 e *K. pneumoniae* CCBH 15668 foram usadas como controle positivo dos inibidores PBA e EDTA, respectivamente.

4.6 Critérios de interpretação

4.6.1 CLSI

Na Tabela 2 podem ser observados os pontos de cortes clínico para interpretação da susceptibilidade aos carbapenêmicos para os membros da família

Enterobacteriaceae pelos métodos de difusão do disco e determinação da CMI de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2016).

Tabela 2- Pontos de cortes clínico dos carbapenêmicos para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2016).

Carbapenêmico	Ponto de corte para CMI (mg/L)			Ponte de corte para diâmetro do halo (mm)		
	S ≤	RI	R ≥	S ≥	RI	R ≤
Ertapenem	≤ 0,5	1	≥ 2	≥ 22	19--21	≤ 18
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4	≥ 23	20--22	≤ 19
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4	≥ 23	20--22	≤ 19

CMI – Concentração mínima inibitória; S- Sensível; RI- Resistência intermediária, R- Resistente

Segundo o CLSI (2016), a pesquisa de carbapenemases pelo teste MHT ou outros métodos confirmatórios deve ser realizada em todas as amostras que apresentarem resultados de R ou RI a pelo menos um dos carbapenêmicos.

4.6.2 BrCAST

Na Tabela 3 estão descritos os pontos de corte clínicos para a categorização de amostras da família *Enterobacteriaceae* em R, RI ou S aos carbapenêmicos pelos métodos de DD e determinação da CMI de acordo com o preconizado pelo manual BrCAST (2016).

Tabela 3 - Pontos de cortes clínico dos carbapenêmicos para a família *Enterobacteriaceae* (BrCAST, 2016).

Carbapenêmico	Ponto de corte para CMI (mg/L)			Ponte de corte para diâmetro do halo (mm)		
	S ≤	RI	R >	S ≥	RI	R <
Ertapenem	≤ 0,5	1	> 1	≥ 25	22--24	< 22
Imipenem	≤ 2	4--8	> 8	≥ 22	16--21	<16
Meropenem	≤ 2	4--8	> 8	≥ 22	16--21	<16

CMI – Concentração mínima inibitória; S- Sensível; RI- Resistência intermediária, R- Resistente

Além disso, o manual em questão recomenda o uso de testes fenotípicos confirmatórios, com destaque para teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases para pesquisa da produção de carbapenemases em todas as amostras que apresentem sensibilidade diminuída a pelo menos um dos carbapenêmicos, para

selecionar as amostras que devem ser encaminhadas aos testes confirmatórios o manual apresenta pontos de corte para de triagem (Tabela 4).

Tabela 4 - Pontos de corte para triagem de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (BrCAST, 2015).

Carbapenêmico	Ponto de corte para triagem CMI (mg/L)	Ponto de corte para triagem diâmetro do halo (mm)
Ertapenem	> 0,12	< 25
Imipenem	> 1	< 23
Meropenem	> 0,12	< 25

CMI – Concentração mínima inibitória

5 RESULTADOS

5.1 Identificação fenotípica

Todas as 47 amostras incluídas no estudo foram confirmadas como *Klebsiella pneumoniae* após interpretação da morfologia pela coloração de Gram e das provas bioquímicas utilizadas, sendo observados bacilos Gram-negativos, oxidase negativa, produção de indol e motilidade negativos, hidrólise da uréia, descarboxilação de lisina e utilização de citrato positivos, fermentação de glicose, lactose e/ou sacarose e produção de gás (CO₂).

5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Através do teste de DD, foi observado que as 47 amostras apresentaram resistência aos antimicrobianos ampicilina e piperacilina e 46 (98%) ao aztreonam. Em relação às cefalosporinas, todas as 47 (100%) amostras apresentaram resistência a cefazolina, 45 (96%) a cefepime, 42 (89%) a ceftazidima, 41 (87%) a cefotaxima e 34 (72%) foram resistentes a ceftioxima. Para os antimicrobianos da classe das quinolonas foi observado o seguinte perfil: 44 (94%) amostras apresentaram resistência a ofloxacina, 42 (89%) a ciprofloxacina, 41 (87%) a norfloxacina e 40 (85%) a levofloxacina. Entre as amostras resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos com presença de inibidor, 43 (91%) amostras foram resistentes a amoxicilina-clavulanato, 42 (89%) a ticarcilina-clavulanato e 37 (79%) a piperacilina-tazobactam. O perfil de resistência aos aminoglicosídeos se apresentou da seguinte forma: 38 (81%) amostras foram resistentes a tobramicina, 29 (62%) a gentamicina e 16 (34%) foram resistentes a amicacina. Em relação aos demais agentes antimicrobianos, 42 (89%) amostras foram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprima, 35 (74%) amostras resistentes a nitrofurantoína, 34 (72%) amostras resistentes ao cloranfenicol e 28 (60%) amostras resistentes a tetraciclina. O Gráfico 1 apresenta as taxas de resistência das amostras frente aos antimicrobianos testados. Todas as 47 amostras de *K. pneumoniae* albergando o gene *bla*_{KPC} foram classificadas como MDR.

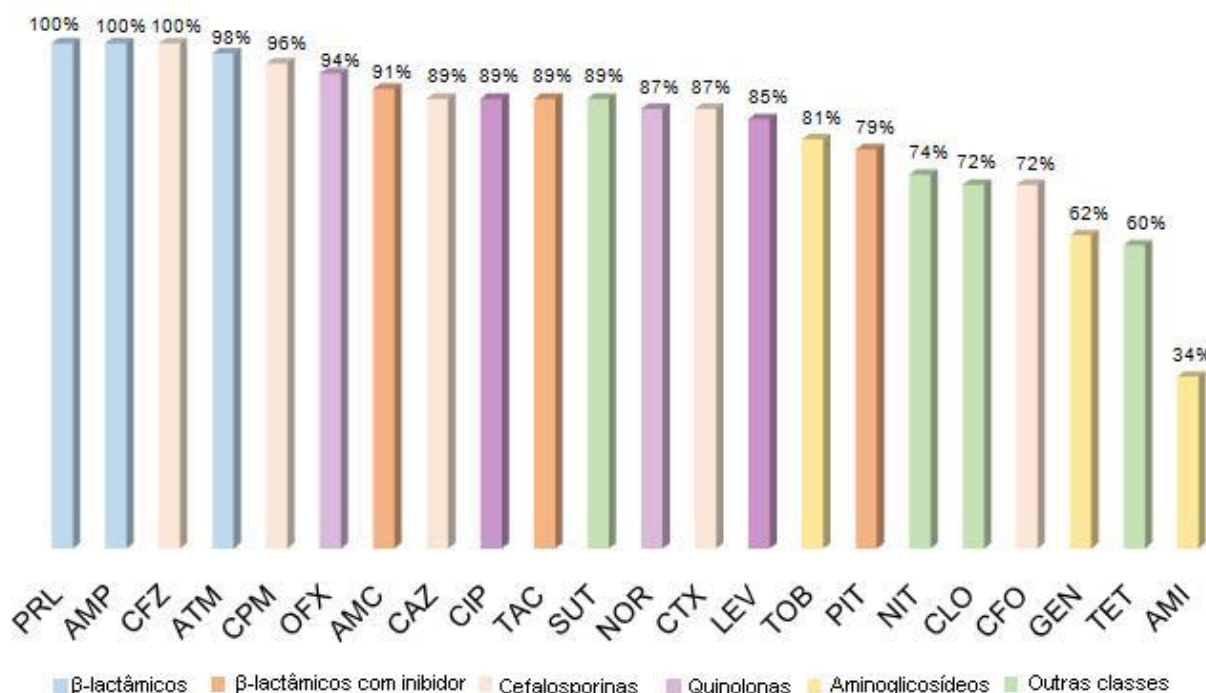


Gráfico 1 - Perfil de resistência aos antimicrobianos testados das 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae*. PRL – piperacilina, AMP – ampicilina, CFZ- cefazolina, ATM – aztreonam, CPM – cefepime, OFX – ofloxacina, AMC – amoxicilina-clavulanato, CAZ – ceftazidima, CIP – ciprofloxacina, TAC – ticarcilina-clavulanato, SUT – sulfametoxazol-trimetoprima, NOR – norfloxacina, CTX – cefotaxima, LEV – levofloxacina, TOB – tobramicina, PIT – piperacilina-tazobactam, NIT – nitrofurantoína, CLO – cloranfenicol, CFO – ceftoxitina, GEN – gentamicina, TET – tetraciclina, AMI – ampicilina.

5.3 Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos

5.3.1 Método de difusão do disco

A Tabela 5 mostra os resultados da classificação segundo os critérios interpretativos do CLSI (2016) e BrCAST (2016). De acordo com o CLSI (2016) foi observado que 38 (80,9%) amostras foram classificadas como R ao ERT, 4 (8,5%) como RI e 5 (10,6%) como S para este antimicrobiano. Para o IPM foi observado o seguinte perfil: 24 (51,16%) amostras foram classificadas como R, 9 (19,1%) como RI e 14 (29,8%) como S. Enquanto isso, para o MPM 33 (70,2%) amostras foram consideradas como R, 4 (8,5%) como RI e 10 (21,3%) como S. Segundo o manual BrCAST (2016) foi observado que para o ERT 42 (89,4%) amostras foram classificadas como R e o restante 5 (10,6%) como RI. Já para o IPM, 16 (34,1%) amostras foram R, 16 (34,1%) amostras foram RI e 15 (31,9%) foram S. Enquanto que para o MPM 19 (40,4%) foram classificadas como R, 18 (38,3%) como RI e 10 (21,3%) como S.

Considerando o resultado dos três carbapenêmicos em conjunto, o número total de amostras classificadas como R aos carbapenêmicos foi de 38 (80,9%) amostras pelos critérios do CLSI e 42 (89,4%) de acordo com os critérios propostos pelo BrCAST.

Tabela 5 - Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos pelo método de difusão em disco segundo os manuais de interpretação do CLSI e BrCAST.

ATM	CLSI				BrCAST	
	Nº (%) de amostras					
	S	RI	R	S	RI	R
ERT	5 (10,6%)	4 (8,5%)	38 (80,9%)	0 (0%)	5 (10,6%)	42 (89,4%)
IPM	14 (29,8%)	9 (19,1%)	24 (51,1%)	15 (31,9%)	16 (34%)	16 (34%)
MPM	10 (21,3%)	4 (8,5%)	33 (70,2%)	5 (10,7%)	18 (38,3%)	19 (40,4%)
Total amostras R*	-	-	38 (80,9%)	-	-	42 (89,4%)

ATM- Antimicrobiano; ERT- Ertapenem; IPM- Imipenem; MPM- Meropenem; S- Sensível; RI- Resistência intermediária, R- Resistente.

*Considera-se a amostra R aos carbapenêmicos quando a mesma apresenta R a pelo menos um deles.

5.3.2 Método de determinação da CMI

A Tabela 6 mostra os resultados da classificação segundo os critérios interpretativos do CLSI (2016) e BrCAST (2016). De acordo com o CLSI (2016) para o antimicrobiano ERT, 28 (59,6%) amostras foram categorizadas como R, 8 (17,0%) como RI e 11 (23,4%) como S. Para o IPM, 25 (53,2%) amostras foram R, 4 (8,5%) amostras foram RI e 18 (38,3%) foram S. Enquanto que para o MPM foi observado que 24 (51,1%) amostras foram R, 10 (21,3%) foram RI e 13 (27,7%) foram S. Segundo o manual BrCAST (2016) para o ERT, 31 (66,0%) amostras foram R, 5 (10,7%) foram RI e 11 (23,4%) foram S. Já para o IPM foi verificado que 18 (38,3%), 7 (14,9%) e 22 (46,8%) foram R, RI e S, respectivamente. Para o MPM, 17 (36,2%) amostras foram R, 7 (14,9%) foram classificadas como RI e 23 (48,9%) como S.

Considerando o resultado dos três carbapenêmicos em conjunto, o número total de amostras classificadas como R aos carbapenêmicos foi de 31 (66%) amostras pelos critérios do CLSI e 32 (68,1%) de acordo com os critérios propostos pelo BrCAST.

Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos pelo método de determinação da CMI segundo os manuais de interpretação do CLSI e BrCAST.

ATM	CLSI			BrCAST		
	Nº (%) de amostras					
	S	RI	R	S	RI	R
ERT	11 (23,4%)	8 (17,0%)	28 (59,6%)	11 (23,4%)	5 (10,6%)	31 (66%)
IPM	18 (38,3%)	4 (8,5%)	25 (53,2%)	22 (46,8%)	7 (14,9%)	18 (38,3%)
MPM	13 (27,7%)	10 (21,3%)	24 (51,1%)	23 (48,9%)	7 (14,9%)	17 (36,2%)
Total amostras R*	-	-	31 (66%)	-	-	32 (68,1%)

ATM- Antimicrobiano; ERT- Ertapenem; IPM- Imipenem; MPM- Meropenem; S- Sensível; RI- Resistência intermediária, R- Resistente

*Considera-se a amostra R aos carbapenêmicos quando a mesma apresenta R a pelo menos um deles.

5.4 Seleção de amostras para realização dos testes confirmatórios

5.4.1 Método de difusão do disco

De acordo com os resultados obtidos para o ERT foram selecionadas 42 (89,4%) e 47 (100%) amostras segundo o CLSI e BrCAST, respectivamente. Para o IPM, 33 (70,2%) e 35 (74,5%) amostras foram selecionadas segundo o CLSI e o BrCAST, respectivamente. Enquanto isso, para o MPM, 37 (78,7%) e 45 (95,7%) amostras foram selecionadas de acordo com o CLSI e BrCAST, respectivamente (Tabela 7).

5.4.2 Método de determinação da CMI

Para o ERT, 36 (76,6%) amostras foram selecionadas pelo CLSI e 43 (91,5%) pelo BrCAST. Para o IPM, 29 (61,7%) foram selecionadas por ambos manuais e para o MPM, foram selecionadas 34 (72,3%) e 43 (91,5%) amostras pelo CLSI e BrCAST, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de amostras de *K. pneumoniae* selecionadas para os testes confirmatórios pelos métodos de DD e determinação da CMI segundo os critérios do CLSI e BrCAST.

ATM	Método de DD		Método de determinação CMI	
	CLSI	BrCAST	CLSI	BrCAST
ERT	42 (89,4%)	47 (100%)	36 (76,6%)	43 (91,5%)
IPM	33 (70,2%)	35 (74,5%)	29 (61,7%)	29 (61,7%)
MPM	37 (78,7%)	45 (95,7%)	34 (72,3%)	43 (91,5%)
Total de amostras selecionadas*	42 (89,4%)	47 (100%)	39 (83,0%)	45 (95,7%)

ATM- Antimicrobiano; ERT- Ertapenem; IPM- Imipenem; MPM- Meropenem; DD- Difusão do disco; CMI- Concentração Mínima Inibitória. *Considerando o resultado dos 3 carbapenêmicos

Considerando os resultados dos três carbapenêmicos em conjunto foram selecionadas um total de 42 (89,4%) amostras e 39 (83,0%) amostras de acordo com o CLSI pelos métodos de DD e determinação da CMI, respectivamente. E pelos critérios do BrCAST todas as amostras foram selecionadas pelo método de DD e 45 (95,7%) amostras de acordo com o método de determinação da CMI.

5.5 Métodos fenotípicos confirmatórios para produção de carbapenemase

5.5.1 Teste de Hodge Modificado

A interpretação do MHT utilizando os critérios do CLSI (2016) indicou a presença de carbapenemase em 40 (85,1%) amostras e em 7 (14,9%) amostras o resultado foi negativo.

5.5.2 Teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases

No teste com inibidores foi observado que 37 (78,7%) amostras foram positivas para o PBA, 3 (6,4%) amostras foram positivas para o PBA e EDTA, 7 (14,9%) amostras não apresentaram sinergismo com nenhum dos inibidores e nenhuma amostra foi positiva para a CLOXA, ou seja, não foram consideradas produtoras de

enzimas AmpC. A classificação das amostras segundo o algoritmo de interpretação do teste de sinergismo proposto pelo BrCAST indicou: 40 (85,1%) amostras como produtoras de carbapenemases, sendo 37 (78,7%) amostras produtoras de carbapenemase da classe A (KPC entre outras) e 3 (6,4%) amostras produtoras de carbapenemase da classe B (M β L) em associação com carbapenemase da classe A. As demais 7 (14,9%) amostras que não apresentaram resultado positivo com nenhum inibidor, foram consideradas não produtoras de carbapenemase, e segundo o BrCAST o mecanismo mais provável da resistência fenotípica aos carbapenêmicos seria pela presença de ESBL associado com a perda de porina. Interessante ressaltar que estas 7 amostras são as mesmas do grupo que apresentou resultado negativo pelo MHT.

6 DISCUSSÃO

Durante muitos anos os carbapenêmicos foram considerados os antimicrobianos de última escolha para o tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias MDR, incluindo as produtoras de ESBL e AmpC. Porém, a disseminação das enzimas KPC e de outras carbapenemases comprometeram a efetividade clínica dessa classe de antimicrobianos (CAMPOS et al., 2016; DAIKOS; MARKOGIANNAKIS, 2011). Nossos resultados refletem esta realidade, pois todas as 47 amostras de *K. pneumoniae* albergando o gene *bla*_{KPC} apresentaram fenótipo MDR (não susceptibilidade a pelo menos 3 classes de antimicrobianos). Sendo que 30 (63,8%) dessas amostras apresentaram fenótipo XDR (susceptibilidade a somente uma ou duas classes de antimicrobianos) e dessas, 2 (4,3%) amostras foram PDR (susceptibilidade a nenhum dos antimicrobianos testados).

Atualmente, tigeciclina, polimixinas e aminoglicosídeos são considerados os antimicrobianos mais efetivos para combater as infecções causadas por BGNs produtores de carbapenemases (CAMPOS et al., 2016; DAIKOS; MARKOGIANNAKIS, 2011). Entretanto, nossos resultados mostraram elevadas taxas de resistência aos aminoglicosídeos (81% TOB, 62% GEN e 34% AMI).

Vários trabalhos têm chamado a atenção para emergência de resistência a tigeciclina e colistina. Resistência a tigeciclina (8,3%) e colistina (33,3%) foram relatadas em um estudo realizado em hospitais da Alemanha com nove cepas de *Escherichia coli* e 36 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KAASE et al., 2016). Um estudo realizado na Itália com 94 isolados de *K. pneumoniae* apresentando o gene *bla*_{KPC} também relatou taxas elevadas de resistência a colistina (42%) (BONURA et al., 2015). Dados do Programa de Vigilância aos Antimicrobianos (SENTRY) da América Latina mostraram 3% de resistência a colistina entre 1.052 cepas de *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos isoladas no período de 2008-2010 (GALES et al., 2012). Também foram encontradas taxas de resistência de 14,9% e 10,6% a tigeciclina e colistina, respectivamente, entre as 47 amostras de *K. pneumoniae* utilizadas neste estudo, em análise posterior do perfil de susceptibilidade pelo método de gradiente em escala (dados não mostrados).

É notório que a localização plasmidial do gene *bla*_{KPC} contribui para a disseminação de cepas MDR resultando em poucas opções terapêuticas. Nos últimos anos a disseminação de BGNs produtores de carbapenemases gerou a necessidade

dos laboratórios de diagnóstico microbiológico adotar testes capazes de identificar os diferentes tipos de mecanismos de resistência fenotípica aos carbapenêmicos para direcionar o tratamento adequado e possibilitar a rápida implementação das medidas de controle nos hospitais. Entretanto, a detecção desses microrganismos representa um desafio para os laboratórios de microbiologia, pois algumas cepas não são detectadas pelos métodos convencionais por não expressarem ou expressarem as carbapenemases em baixos níveis, sendo comum a variação dos resultados de acordo com os métodos utilizados (BULIK et al., 2010; MOSCA et al., 2013). Além disso, enzimas KPC demonstram atividade variável de hidrólise aos carbapenêmicos, sendo que o fenótipo de resistência a esses antimicrobianos depende de genes de regulação da expressão da enzima e do ambiente genético no qual o gene *bla_{KPC}* está localizado, assim como alterações na permeabilidade da membrana externa. Essas características são responsáveis pela variação nas CMI de carbapenêmicos frente a bactérias produtoras de KPC (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Como esperado, nossos resultados mostraram variações no perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos tanto em função do tipo de carbapenêmico, do tipo de método usado e do critério de ponto de corte clínico (manual) adotado.

Verificamos, primeiramente, a variação nos resultados em função do desempenho dos carbapenêmicos. O ERT demonstrou maior capacidade de selecionar corretamente as amostras portadoras do gene *bla_{KPC}* em ambos métodos (DD e CMI) considerando os critérios de interpretação em ambos manuais; seguido pelo MPM e IMP. Porém, cabe ressaltar que tanto o CLSI quanto o BrCAST preconizam o uso dos três carbapenêmicos independentemente do método e que uma cepa seja classificada como R aos carbapenêmicos quando apresentar R a pelo menos um deles. Com base nessa premissa, o número total de amostras consideradas como R aos carbapenêmicos pelo método de DD continuou de 38 (80,9%) pelo CLSI e 42 (89,4%) pelo BrCAST, já que todas as amostras que apresentaram R a MPM ou IMP também foram R ao ERT, enquanto que pelo método de determinação da CMI este número aumentou para 31 (66%) pelo CLSI e 32 (68,1%) pelo BrCAST, já que algumas amostras (3 pelo CLSI e 1 pelo BrCAST) classificadas com R a MPM ou IMP não foram classificadas como R ao ERT (Tabelas 5 e 6).

De acordo com Hammoudi e colaboradores (2014) o ERT é o melhor candidato entre os carbapenêmicos para detectar a maioria das carbapenemases entre as

enterobactérias, pois o valor da sua CMI geralmente é maior que a CMI encontrada nos outros carbapenêmicos. Nordmann, Cuzon e Naas (2009) relatam que os testes de susceptibilidade utilizando MPM ou IPM não são sensíveis o suficiente para detecção de produtores de KPC nas enterobactérias. As taxas de sensibilidade para o ERT em *K. pneumoniae* produtoras de KPC variam de 0 a 6%, enquanto para o MPM e IPM essas taxas variam entre 16-52% e 26-29%, respectivamente. Entretanto, um fator limitante para o uso do ERT sozinho é que a especificidade pode ser reduzida devido à resistência por outros mecanismos como a hiperprodução de AmpC ou ESBL com perda de porina (BIRGY et al., 2012; HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; QUEENAN; BUSH, 2007). Por diversas situações como o custo ou a dificuldade no processo de aquisição dos antimicrobianos alguns laboratórios não seguem o uso preconizado dos três carbapenêmicos, geralmente se limitam ao MPM e/ou IPM e assim, muito provavelmente estão gerando resultados de falsa-susceptibilidade para carbapenêmicos. Portanto, ressaltamos a importância do uso dos três carbapenêmicos nos testes de susceptibilidade como garantia de maior acurácia.

Observamos também variações entre os métodos de DD e de determinação da CMI independente dos critérios de interpretação adotados. O método de DD classificou um maior número de amostras resistentes em relação a CMI em ambos manuais (80,9% DD x 66% CMI pelo CLSI e 89,4% DD x 68% CMI pelo BrCAST). Resultados similares foram observados por Vading e colaboradores (2011) que realizaram um estudo com amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC n=31 e VIM n=20) através dos métodos de DD e de determinação da CMI utilizando tiras de Etest®. Já em um estudo realizado na Suíça que avaliou os resultados de DD para ERT, MPM e IPM em 142 amostras clínicas de enterobactérias com suspeita de produzir carbapenemase também demonstrou que o método de DD apresentou alta sensibilidade para classificar corretamente os três carbapenêmicos como R, sendo: 100% de sensibilidade para o ERT e MPM e 81,8% para o IPM (MAURER et al., 2015). Uma possível explicação para a baixa acurácia do método de gradiente em escala seria a dificuldade de interpretação. Muitos estudos relataram a presença de colônias satélites na zona de inibição, especialmente em *K. pneumoniae*, comprometendo a correta leitura do resultado (Figura 8) (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; VADING et al., 2011).

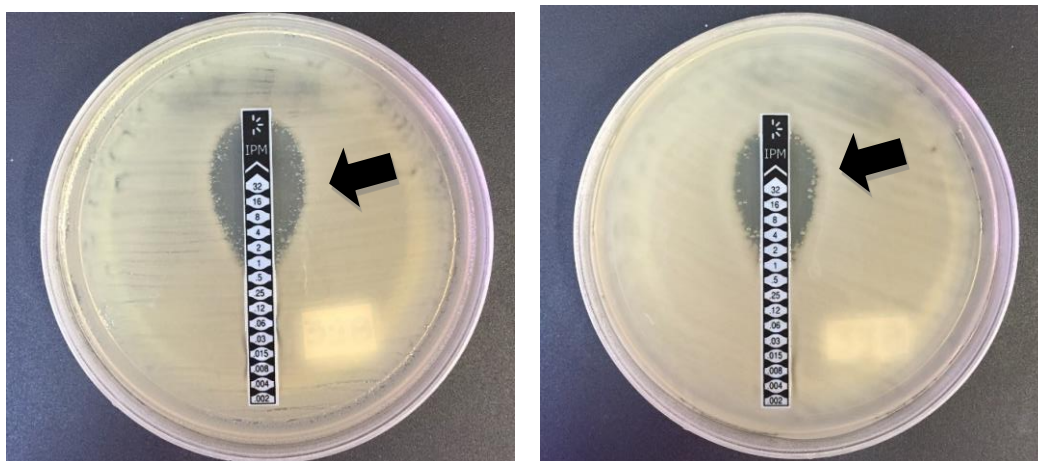


Figura 8- Presença de colônias satélites na zona de inibição das amostras 31B e 36B para determinação da CMI do IPM utilizando fitas de M.I.C.E®.

Considerando nossos resultados, recomendamos o uso do método de DD com os três carbapenêmicos pelos laboratórios de microbiologia clínica. Além de ter se apresentado com maior acurácia, apresenta melhor custo-benefício por ser tratar de um método de fácil execução e baixo custo, ao contrário do método de determinação da CMI. Os laboratórios que elegem realizar o método de determinação da CMI através de tiras de gradiente em escala devem fazê-lo para o ERT, MPM e IPM, gerando um maior impacto econômico para o laboratório, uma vez que o valor unitário de uma tira de Etest® é em média 84 vezes maior que o valor unitário de um disco do antimicrobiano carbapenêmico.

Por último, analisamos os resultados segundo as diferenças nos critérios interpretativos do CLSI e BrCAST. Através dos pontos de corte clínico estabelecidos pelos manuais de referência as amostras bacterianas são classificadas como S, RI ou R a um determinado antimicrobiano e o perfil obtido tem como objetivo guiar o uso desses agentes no tratamento. Os pontos de corte clínico permitem distinguir entre pacientes em que é esperado o sucesso terapêutico, dos pacientes com maior probabilidade de falha no tratamento. O CLSI e o BrCAST adotam pontos de cortes clínicos diferentes para orientar a interpretação do perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos e como consequência, classificações diferentes podem ser reportadas dependendo do manual adotado, fato que pode afetar a decisão clínica no momento da escolha da terapia mais apropriada. Cabe destacar que o BrCAST é baseado no que foi estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), portanto os pontos de cortes clínico são os mesmos do manual europeu. Além disso, este manual tem como finalidade padronizar, em

nível nacional, as normas dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos adaptando os conceitos do EUCAST à realidade dos laboratórios brasileiros (CANTÓN et al., 2014; KASSIM et al., 2016; MOUTON et al., 2012; MUNOZ-PRICE et al., 2013). Em nosso estudo, os critérios estabelecidos pelo BrCAST foram capazes de classificar um número maior de amostras como R aos carbapenêmicos independentemente do método empregado (80,9% DD x 66% CMI pelo CLSI e 89,4% DD x 68% CMI pelo BrCAST). Vading e colaboradores (2011) também verificaram que utilizando os critérios de interpretação do EUCAST um número maior de amostras de *K. pneumoniae* (KPC n=31 e VIM n=20) foi coerente com o esperado para identificar uma amostra produtora de carbapenemase. Outro estudo com 142 amostras clínicas de enterobactérias com suspeita de produzir carbapenemases avaliou os resultados de DD para ERT, MPM e IPM aplicando os pontos de cortes clínico do CLSI e EUCAST e concluiu que utilizando os critérios do CLSI a sensibilidade do ERT e MPM foi menor que a encontrada segundo os critérios do EUCAST (MAURER et al., 2015).

A suspeita inicial que indica a presença de carbapenemase em uma amostra clínica é baseada no aumento da CMI ou diminuição do diâmetro do halo de inibição observado pelo método de DD. Elevadas CMIs aos carbapenêmicos geralmente são preditivas de produção de carbapenemase entre as enterobactérias, porém nem sempre é observada a resistência a esses agentes pelos critérios adotados pelos comitês. A categorização das amostras seguindo os manuais de referência pode gerar resultados de falsa susceptibilidade aos carbapenêmicos em amostras que apresentam o gene *bla_{KPC}*. Assim, os pontos de corte clínico estabelecidos podem ser úteis para guiar a escolha terapêutica, porém não são adequados para detecção da produção de carbapenemases, uma vez que outros mecanismos de resistência podem gerar resultados de resistência fenotípica. Para isso, tanto o BrCAST quanto o CLSI adotam pontos de corte de triagem para os carbapenêmicos com o objetivo de selecionar as amostras que devem ser submetidas a testes confirmatórios para a produção de carbapenemases. Por um lado, os critérios estabelecidos pelo CLSI se baseiam na resistência aos carbapenêmicos após aplicação dos pontos de corte clínico cujos valores foram inicialmente padronizados com o objetivo de detectar amostras produtoras de carbapenemase. Por outro lado, os pontos de corte clínico preconizados pelo BrCAST não foram estabelecidos para detecção de mecanismos de resistência e sim para manter valores que resultem em boa escolha para o tratamento do paciente. E como adicional, o manual brasileiro publicou um guia

exclusivo para detecção de mecanismos de resistência, incluindo a produção de enzimas carbapenemases, utilizando pontos de corte de triagem que são inferiores aos pontos de corte clínico (CANTÓN et al., 2014; HAMMOUDI; AYOUB MOUBARECK; KARAM SARKIS, 2014; QUEENAN; BUSH, 2007).

Neste contexto, verificamos divergência na seleção das amostras conforme os pontos de corte de triagem aplicado em relação ao carbapenêmico, o método empregado e o manual utilizado para interpretação. O primeiro ponto a ser ressaltado é a diferença nos critérios de seleção. Pelo CLSI, devem ser investigadas as amostras que apresentam não susceptibilidade (RI ou R) a pelo menos um dos carbapenêmicos, enquanto o BrCAST preconiza que devem ser investigadas as amostras com sensibilidade diminuída a pelo menos um carbapenêmico e para isso, indica pontos de corte de triagem expressos em CMI ou diâmetro de halo de inibição ainda na faixa de sensibilidade. Considerando que algumas cepas produtoras de carbapenemases vão ser classificadas como susceptíveis aos carbapenêmicos é de se esperar que o critério adotado pelo BrCAST selecione um maior número de amostras para os testes confirmatórios. Este fato foi observado em nossos resultados, uma vez que todas as amostras foram selecionadas pelo método de DD e apenas duas (4,3%) amostras não foram selecionadas pelo método de determinação da CMI, em contraste com o CLSI que selecionou um número menor de amostras (42/89,4% pelo DD e 39/83,0% pela CMI). Novamente, o método de DD com os critérios de triagem do BrCAST foi o único capaz de selecionar 100% das amostras.

Até o presente momento, existem poucas opções de testes fenotípicos capazes de detectar a produção de carbapenemases de forma satisfatória (GENC; AKSU; GULCAN, 2016). O CLSI sugere o uso do MHT como teste confirmatório. Em nosso estudo, a interpretação do MHT utilizando os critérios do CLSI (2016) indicou a presença de carbapenemase em 40 (85,1%) amostras e em 7 (14,9%) amostras o resultado foi negativo. Uma possível explicação para as 7 amostras que apresentaram resultado negativo pode ser devido à fraca produção de carbapenemase, uma vez que a positividade do método depende que a atividade enzimática ocorra em quantidade suficiente nas condições de cultivo em 18-24h para então diminuir a quantidade de carbapenêmico em níveis não inibitórios para a cepa de *E. coli* ATCC 25922 (PASTERAN et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014). Alguns trabalhos mostram que a expressão da enzima KPC é variável entre cepas de *K. pneumoniae* (CANTÓN et al.,

2014; LANDMAN; BRATU; QUALE, 2009; NORDMANN et al., 2012; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; VADING et al., 2011).

O manual para detecção de mecanismos de resistência aos carbapenêmicos preconizados pelo BrCAST (2015) não recomenda a utilização do MHT devido à baixa especificidade e ao comprometimento da sensibilidade como nos casos da presença de carbapenemase da classe B (NDM, entre outras). O método fenotípico para confirmação da produção de carbapenemase indicado por este manual é o teste de sinergismo com inibidores de β -lactamases. Ao contrário do MHT, através desse método é possível distinguir a classe da carbapenemase envolvida e, além disso, é um método bem validado em estudos que têm mostrado alta sensibilidade e especificidade. Um estudo realizado por Van Dijk e colaboradores (2014) comprovou isso ao avaliar 128 amostras de enterobactérias pelo MHT e pelo método com inibidores, sendo 99 dessas amostras produtoras de carbapenemase (classe A, n=37; classe B, n=31 e classe A e B simultâneos, n=4) e 29 não produtoras. Os dois métodos apresentaram alta sensibilidade, sendo: 99% para o MHT (não determina a classe da enzima) e para o método com os inibidores de carbapenemase da classe A e classe B a sensibilidade variou de 90-100%. Porém a especificidade do MHT foi de apenas 59%, já a especificidade do teste com inibidores variou de 96 a 99%. Resultados similares de sensibilidade e especificidade para esses métodos foram reportados no estudo de Giske e colaboradores (2010) ao avaliar 68 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC, n=34; VIM, n=21; IMP, n=4; OXA-48, n=9) e 14 amostras não produtoras. O MHT apresentou 100% e 78% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, enquanto o inibidor de carbapenemase de classe A (PBA) apresentou 100% de sensibilidade e 98% de especificidade. A baixa especificidade do MHT reportada nos estudos citados foi consequência de resultados falsos positivos em cepas produtoras de AmpC. No teste com inibidores esses resultados são minimizados devido à adição de discos suplementados com a solução de CLOXA (GISKE et al., 2011; NORDMANN et al., 2012).

A não detecção da produção de carbapenemase em 7 amostras pelos métodos confirmatórios pode estar relacionado com uma variação da produção da carbapenemase ou com a não produção de carbapenemase por algum fator bloqueador da expressão do gene *bla_{KPC}*, uma vez que podem ser necessários estímulos *in vivo* para a produção da enzima KPC que não são observados durante os testes *in vitro*. Pesquisas apontam que determinadas classes de antimicrobianos

podem fornecer os estímulos necessários para aumentar a expressão do gene *bla_{KPC}* (ROTH; LISTER; HANSON, 2013). Roth, Lister e Hanson (2013) observaram modificação na expressão do gene *bla_{KPC}* em quatro diferentes gêneros de BGNs após exposição a antimicrobianos de múltiplas classes, incluindo β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Em outros estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos que contribuem para a variabilidade nas CMI dos carbapenêmicos, foi constatado que a presença dos genes de ESBL e a diminuição da expressão das porinas OmpK35 e/ou OmpK36 contribuíram para o aumento da CMI dos carbapenêmicos (LANDMAN; BRATU; QUALE, 2009; ZHANG et al., 2014). Uma menor expressão da carbapenemase pode contribuir para a disseminação silenciosa de cepas resistentes no ambiente hospitalar, pois tais cepas podem apresentar CMI baixas para os carbapenêmicos na faixa de sensibilidade ou podem apresentar resultados dos testes confirmatórios negativos (MELETIS; CHATZIDIMITRIOU; MALISIOVAS, 2015). Em nosso estudo, cerca da metade das 7 amostras que apresentaram resultado negativo no MHT e no teste com inibidores apresentaram susceptibilidade a todos os carbapenêmicos nos métodos de DD (CLSI) e determinação da CMI (CLSI e BrCAST) (Tabela 8). Ou seja, essas 3-4 cepas seriam reportadas como susceptíveis aos carbapenêmicos mesmo albergando o gene *bla_{KPC}*, muito provavelmente evidenciando que tais cepas não estão expressando o gene *in vitro* ou o estão em nível abaixo do detectável pelo método. Esse perfil não foi observado no método de DD utilizando os critérios do BrCAST, pois segundo a interpretação desse manual todas as amostras foram R a pelo menos um dos carbapenêmicos.

Ao se avaliar a presença do gene *bla_{KPC}* e o resultado dos testes fenotípicos foi identificado que houve concordância em 40 (85,1%) amostras entre os métodos MHT e o teste com inibidores enzimáticos. Considerando os seguintes critérios de classificação que diz respeito ao impacto clínico dos resultados discrepantes como: “erro muito grande” (presença do gene e resultado negativo no teste fenotípico) ou “erro grande” (ausência do gene e resultado positivo no teste fenotípico) (BRETELIER et al., 2011) temos que os resultados relativos às 7 (14,9%) amostras foram consideradas como um “erro muito grande”, pois indicariam uma terapia inadequada, além de não ser consideradas nas estatísticas epidemiológicas contribuindo para dados subestimados. Assim, uma classificação errônea de falsa susceptibilidade poderia levar a falha terapêutica, visto que os carbapenêmicos ainda figuram como

escolha terapêutica para cepas de BGNs sensíveis a este grupo (CANTÓN et al., 2014; MUNOZ-PRICE et al., 2013; ROTH; LISTER; HANSON, 2013).

Tabela 8 - Perfil genético e fenotípico das 7 amostras de *K. pneumoniae* que apresentaram resultados negativos nos testes confirmatórios.

Amostra	Gene	CLSI*		BrCAST*	
		DD	CMI	DD	CMI
15B	KPC+TEM+SHV+CTX-M	S	S	R	S
43B	KPC+SHV+CTX-M	S	S	R	S
100B	KPC+TEM+SHV+CTX-M	S	S	R	S ^T
17B	KPC+SHV	S	R	R	R
45B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	S ^T
11B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	R
26B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	R

CMI – Concentração Mínima Inibitória; DD – Difusão do Disco; MHT – Teste de Hodge Modificado; NEG – Negativo; S – Sensível; R – Resistente.

*Considerou-se S quando a amostra foi S a todos carbapenêmicos e R quando apresentou R a pelo menos um dos carbapenêmicos

^T Amostras selecionadas aplicando os pontos de corte de triagem proposto pelo manual.

De uma forma geral, das 47 amostras analisadas no estudo, 38 (80,9%) foram corretamente classificadas como RI ou R aos três carbapenêmicos tanto pelo método de DD quanto na determinação da CMI e também segundo interpretação do CLSI e BrCAST. Por outro lado, 9 (19,1%) amostras apresentaram resultados incoerentes com o esperado para o genótipo KPC em pelo menos um dos critérios avaliados. Pelos critérios do CLSI, 5 (10,6%) amostras e 8 (17,0%) amostras foram S a todos os carbapenêmicos pelos métodos de DD e de determinação da CMI, respectivamente. Pelos critérios do BrCAST no método de determinação da CMI, 9 (19,1%) amostras apresentaram o resultado discrepante citado acima. Segundo esse manual, não houve nenhum resultado discrepante pelo método de DD. Apesar desses resultados discrepantes observados segundo os critérios do BrCAST cabe destacar que ainda assim, este manual apresentou um melhor desempenho em selecionar corretamente as amostras para os testes confirmatórios, visto que após aplicar os critérios de triagem falhou em apenas 2 (4,3%) amostras pelo método de determinação da CMI. Já pelos critérios do CLSI todas as 5 (10,6%) amostras e 8 (17,0%) amostras com resultados discrepantes pelos métodos de DD e determinação da CMI,

respectivamente, não seriam encaminhadas para os testes confirmatórios. Em relação aos resultados encontrados no MHT, entre as 40 amostras com resultado positivo, 1 (2,5%) e 5 (12,5%) destas não teriam sido selecionadas pelos critérios de triagem através dos métodos de DD e determinação da CMI, respectivamente. Ou seja, 6 (15%) das 40 amostras que apresentaram resultado positivo no MHT nem seriam indicadas para a realização do mesmo, sendo reportadas como não produtoras de carbapenemase. Considerando as 7 (14,9%) amostras negativas no MHT temos que 3 (DD) e 4 (CMI) amostras foram corretamente selecionadas, entretanto, não apresentaram resultado positivo nos testes de produção de carbapenemase. Já no teste com inibidores todas as 40 amostras que apresentaram resultado positivo foram corretamente selecionadas pelo método de DD e apenas uma (2,5%) dessas amostras não teria sido selecionada para os testes confirmatórios pelo método de determinação da CMI por ter apresentado CMI do ERT e MPM abaixo do ponto de corte de triagem de 0,12 mg/L e do IPM menor que 1 mg/L.

Os resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que os pontos de cortes clínicos dos carbapenêmicos para os membros da família *Enterobacteriaceae* associados aos pontos de corte de triagem para seleção de amostras que devem ser confirmadas para produção de carbapenemase propostos pelo manual BrCAST apresentou um melhor desempenho para selecionar corretamente as amostras de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}* que devem ser encaminhadas aos testes confirmatórios. Para garantir um aumento na acurácia é de suma importância seguir estritamente o preconizado uso dos três carbapenêmicos e, além disso, foi observado que o método de DD seguindo os critérios do manual brasileiro foi o único capaz de selecionar corretamente todas as amostras para os testes confirmatórios. Em relação aos testes fenotípicos avaliados no estudo, ambos identificaram a produção de carbapenemase nas mesmas amostras, porém o método utilizando os inibidores proposto pelo BrCAST tem o diferencial de indicar a classe da enzima envolvida, além de ser um método de fácil execução e economicamente viável de ser empregado nos laboratórios clínicos. Todas as análises realizadas no estudo foram restritas a cepas de *K. pneumoniae* albergando o gene *bla_{KPC}*, uma vez que essa espécie é a principal relacionada com esse mecanismo de resistência aos carbapenêmicos e ocorre de forma endêmica no Brasil (LEE et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

O perfil de susceptibilidade de todas as amostras de *K. pneumoniae* albergando o gene *bla_{KPC}* apresentaram fenótipo MDR (não susceptibilidade a pelo menos 3 classes de antimicrobianos).

O ERT apresentou melhor desempenho que o MPM e IPM em classificar como resistentes as amostras de *K. pneumoniae* albergando o gene *bla_{KPC}*. Para garantir maior acurácia indicamos o uso dos três carbapenêmicos em conjunto para determinar a susceptibilidade aos carbapenêmicos.

O método de DD apresentou maior acurácia do que o método de determinação da CMI para determinar a resistência aos carbapenêmicos nas amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*, sendo que o método de DD utilizando os critérios do BrCAST foi o único capaz de selecionar corretamente todas as amostras para realização dos testes confirmatórios.

Os testes fenotípicos confirmatórios para produção de carbapenemase apresentaram a mesma acurácia, entretanto indicamos o uso do teste de sinergismo com inibidores proposto pelo BrCAST pois o mesmo possui o diferencial de indicar a classe da enzima envolvida, além de ser um método de fácil execução e economicamente viável de ser empregado nos laboratórios clínicos.

Os critérios interpretativos propostos pelo manual BrCAST apresentaram maior acurácia na seleção das amostras que devem ser encaminhadas para os testes confirmatórios de produção de carbapenemase em amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}*.

REFERÊNCIAS

- AMBLER, R. . The structure of Beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321–331, 1980.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 01-2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multirresistentes. Brasília-DF, 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2016 – 2020. Brasília-DF, 2016.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Brasília-DF, 2016.
- BARTOLINI, A. et al. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. **Gut Pathogens**, v. 4, n. 13, 2014.
- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–1851, 2016.
- BINA, M. et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *K. pneumoniae* isolated from the clinical samples by the phenotypic and genotypic methods. **Iranian Journal of Pathology**, v. 10, n. 3, p. 199–205, 2015.
- BIRGY, A. et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1295–1302, 2012.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v. 13, p. 42–51, 2015.
- BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates**, v. 17, p. 24–36, 2014.
- BONURA, C. et al. An update of the evolving epidemic of *bla*_{KPC} carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: emergence of multiple non-ST258 clones. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–9, 2015.
- BORGHI, M. Epidemiologia e caracterização genética da resistência aos beta-lactêmicos em enterobactérias não susceptíveis aos carbapenêmicos. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

BOYLE, D. P.; ZEMBOWER, T. R. Epidemiology and management of emerging drug-resistant gram-negative bacteria extended-spectrum β -Lactamases and beyond. **Urologic Clinics of NA**, v. 42, p. 493–505, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2616, Diário Oficial da União, Brasília, 12 de maio de 1998.

BRASILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica – Versão em Português do EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Disponível em: <http://BrCAST.org.br/documentos/>. Acesso em: 1 jun 2016.

BRASILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos – Versão em Português do EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2016). Disponível em: <http://BrCAST.org.br/documentos/>. Acesso em: 1 jun 2016.

BRASILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Método de Disco-difusão do EUCAST para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos - Versão em Português do the EUCAST Disk Diffusion Method (2015). Disponível em: <http://BrCAST.org.br/documentos/>. Acesso em: 1 jun 2016.

BRETELIER, K. B. K. et al. Performance and clinical significance of direct antimicrobial susceptibility testing on urine from hospitalized patients. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 43, n. 10, p. 771–776, 2011.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3146–3152, 2014.

BULIK, C. C. et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2402–2406, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of Beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for Beta-Lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CAMPOS, A. C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing. *K pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, 2016.

CANTÓN, R. et al. Breakpoints for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Is the problem solved? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 4, p. 33–40, 2014.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Acesso em: 30 jan. 2017.

CDC, Centers for Disease Control and prevention. Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report. 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/>. Acesso em: 27 jan. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. NCCLS, Wayne, Pennsylvania. 2016.

DAIKOS, G. L.; MARKOGIANNAKIS, A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1135–1141, 2011.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354–360, 2012.

GENC, O.; AKSU, E.; GULCAN, A. The identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. **Journal of Microbiological Methods**, 2016.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, p. 137–146, 2011.

GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 552–556, 2011.

HAMMOUDI, D.; AYOUB MOUBARECK, C.; KARAM SARKIS, D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 106–118, 2014.

HIGHSMITH, A. K.; JARVIS, W. R. *Klebsiella pneumoniae*: Selected virulence factors that contribute to pathogenicity. **Infection Control**, v. 6, n. 2, p. 75–77, 1985.

JEAN, S. . et al. Carbapenem susceptibilities and non-susceptibility concordance to different carbapenems amongst clinically important gram-negative bacteria isolated from intensive care units in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 457–462, 2013.

JUNIOR, C. . et al. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 1, p. 11–20, 2014.

KAASE, M. et al. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. **International Journal of Medical Microbiology**, 2016.

KARAMPATAKIS, T. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. **Future Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 809–823, 2016.

KASSIM, A. et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional stud. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 21, 2016.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 385–389, 2007.

KO, W.-C. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 160–166, 2002.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; QUALE, J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1303–1308, 2009.

LEE, C. R. et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 895, 2016.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995.

LUTGRING, J. D.; LIMBAGO, B. M. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-*Enterobacteriaceae* detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 529–534, 2016.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 268–281, 2012.

MARSTON, H. D. et al. Antimicrobial Resistance. **American Medical Association**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **International Microbiology**, v. 7, p. 261–268, 2004.

MAURER, F. P. et al. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 95–104, 2015.

MELETIS, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MALISIOVAS, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2015.

MOSCA, A. et al. Rapid and sensitive detection of *bla_{KPC}* gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. **SpringerPlus**, v. 2, n. 31, p. 1–5, 2013.

MOUTON, J. W. et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: The EUCAST approach. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, 2012.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

MURRAY P.R., BARON E.J., JORGENSEN, et al. Manual of Clinical Microbiology. v.1, 9 ed, Washington (USA); Ed. American Society for Microbiology (ASM). 2007.

NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 432–438, 2012.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. **Medecine et Maladies Infectieuses**, 2013.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 228–236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.

OLIVEIRA, A. et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde ocorridas em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rev. Gaúcha Enferm.**, v. 33, n. 3, p. 89–96, 2012.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancereport/en/>. Acesso em: 27 de jan 2017.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. Disponível em: http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. Acesso em 27 jan. 2017.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Acesso em: 15 de mar 2017.

PASTERAN, F. et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1631–1639, 2009.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2010.

PETRELLA, S. et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A β -Lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3725–3736, 2008.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 371–379, 2010.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RIBEIRO, V. B. et al. Performance of quantification of modified Hodge test: An evaluation with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ROTH, A. L.; LISTER, P. D.; HANSON, N. D. Effect of drug treatment options on the mobility and expression of *bla*_{KPC}. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 2779–2785, 2013.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol**, 2016.

SCOTT II, R. D. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2009.

TSAI, Y. K. et al. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. **PLoS ONE**, 2013.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682–707, 2012.

VADING, M. et al. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 668–674, 2011.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis part 1: Causes and threats. v. 40, n. 4, 2015.

VERMELHO, A.B; BASTOS, M.C.F; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia Geral**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2008.

ZAHEDI BIALVAEI, A. et al. Current methods for the identification of carbapenemases. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 1, 2016.

ZHANG, Y. et al. Contribution of β -lactamases and porin proteins OmpK35 and OmpK36 to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1214–1217, 2014.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO À REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS

SHORT COMMUNICATION

TITLE: Evaluation of the ability of CLSI and EUCAST/BrCAST susceptibility criteria to detect KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

Jaqueline Pegoretti^{1,2}, Mirla Borghi^{1,3}, Ricardo Pinto Schuenck^{1,3} and Ana Paula Ferreira Nunes^{1,2*}

¹Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

²Post-Graduate Program in Infectious Diseases, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

³Post-Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

*Corresponding author: email: ana.p.nunes@ufes.br phone: +55 27 33357543 Mailing address: Universidade Federal do Espírito Santo – UFES Centro Ciências da Saúde – CCS Departamento de Patologia – Microbiologia RESBAC - Laboratório de Resistência Bacteriana Av. Marechal Campos, s/nº, Maruípe - Vitória ES. CEP: 29043-900

Highlights:

- A comparison of methods using CLSI and EUCAST/BrCAST criteria to detect KPC-positive *K. pneumoniae*
- Carbapenem EUCAST/BrCAST criteria correctly detected KPC-positive *K. pneumoniae*
- The use of three carbapenems ensures higher accuracy in susceptibility testing
- The use of EUCAST/BrCAST criteria for the disk diffusion method was the most accurate methodology

Abstract

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains have become a serious public health problem worldwide. Infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* are associated with treatment failure and higher mortality rates. The accurate detection of KPC producers is essential for infection control measures and antibiotic therapies. The Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) was created in 2015 based on European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations. The current clinical breakpoints described in the

manuals used by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and EUCAST/BrCAST are not able to detect all KPC producers. Both manuals present different interpretive criteria and confirmatory tests for the detection of carbapenemase-producing bacteria and what the official manual should be is much debated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the phenotypic methods and interpretive criteria proposed by CLSI and EUCAST/BrCAST using 47 Brazilian KPC-producing *K. pneumoniae* strains. Our results support the conclusion that carbapenem clinical breakpoints and the criteria for the screening of strains proposed by EUCAST/BrCAST performed better than the breakpoints and screening criteria proposed by CLSI to correctly select *K. pneumoniae* strains that were determined to possess the *bla*_{KPC} gene in confirmatory tests. It is important to use three carbapenems to ensure a high accuracy in susceptible testing. Furthermore, it was observed that using the disk diffusion (DD) method and applying EUCAST/BrCAST criteria was the only method capable of correctly selecting all strains for confirmatory tests. Both confirmatory tests used were able to identify carbapenemase production in the same 40 strains. Seven strains showed negative results for confirmatory tests despite the presence of the *bla*_{KPC} gene.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenems, KPC, EUCAST, CLSI

1 - Introduction

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains have become a serious public health problem worldwide. The most prevalent carbapenemases among *K. pneumoniae* strains are the KPC enzymes, which are often associated with other β -lactamases and confer resistance to almost all β -lactam antibiotics and several non- β -lactam antibiotics [1]. Infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* are associated with treatment failure and higher mortality rates compared with infections caused by susceptible strains [1,2].

The accurate detection of KPC producers is essential for infection control measures and may impact the antibiotic therapy selected. The rapid detection of KPC producers in clinical isolates is critical for limiting the spread of this carbapenem resistance mechanism [3,4]. However, the detection of KPC-producing *K. pneumoniae* based on susceptibility tests is a major issue in microbiology laboratories due to the heterogeneous expression of β -lactam resistance mechanisms [1,2,5].

The current clinical breakpoints used by CLSI and EUCAST are not able to detect all KPC producers. Intermediate susceptibility and even susceptibility to carbapenems have been observed in these isolates [5]. Although the molecular identification of carbapenemase genes is the gold standard, phenotypic identification is indicated when these methods are not available [3,4]. For this purpose, CLSI recommends the use of a modified Hodge test (MHT) and EUCAST suggests the use of an inhibitor-based method [6,7].

The BrCAST was created in 2015 based on EUCAST recommendations [7], and the established clinical breakpoints are the same for both the Brazilian and European guidelines. The goal of BrCAST is to standardize antibiotic susceptibility testing at the national level and fully adapt EUCAST concepts to Brazilian laboratories. However, many Brazilian laboratories follow CLSI recommendations. The CLSI and EUCAST manuals present different interpretive criteria and confirmatory tests for the detection of carbapenemase-producing bacteria, and there is much debate over what the official manual should be. Therefore, the aim of this study was to evaluate the methods and interpretive criteria proposed by CLSI and EUCAST/BrCAST using Brazilian KPC-producing *K. pneumoniae* strains.

2 - Materials and Methods

2.1 - Bacterial strains

A total of 47 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates were collected from 16 Brazilian hospitals in 2014. Microorganisms were isolated from multiple infection sites, including urine (27.7%, n=13), blood (25.5%, n=12), secretion (21.3%, n=10), catheter (12.8%, n=6), tracheal aspirate (8.5%, n=4), peritoneal liquid (2.1%, n=1) and bone fragment (2.1%, n=1) specimens. Strain identification was confirmed by conventional biochemical and microbiological tests. All isolates were investigated by multiplex PCR for the detection of the *bla*_{KPC}, *bla*_{IPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{CTX-M} genes. Of all the carbapenemases evaluated by PCR, only KPC enzyme was detected among the isolates, and was associated with at least one ESBL gene.

2.2 - Disk diffusion susceptibility testing

Antibiotic susceptibility tests were performed and interpreted according to BrCAST/EUCAST [8] by disk diffusion method for the following 25 antibiotics (Sensidisc, DME, São Paulo, Brazil): amikacin (30µg), amoxicillin-clavulanate (30µg), ampicillin (10µg), aztreonam(30µg), cefazoline (30µg), cefepime (30µg), cefotaxime (30µg), cefoxitin (30µg), ceftazidime (30µg), ciprofloxacin (5µg), chloramphenicol (30µg), ertapenem(10µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), levofloxacin (5µg), meropenem(10µg), nitrofurantoin (300µg), norfloxacin (10µg), ofloxacin (5µg), piperacillin (30µg), piperacillin-tazobactam (110µg), tetracycline (30µg), ticarcillin-clavulanate (85µg), tobramycin (10µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg). The carbapenems were interpreted using both CLSI [6] and BrCAST/EUCAST [7] criteria to categorize each isolate as susceptible, intermediate or resistant to each carbapenem.

2.3 - MIC determination by the antimicrobial gradient method

The MICs for ERT (Etest®, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), MPM and IPM (M.I.C.E®, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK) were determined according to the manufacturer's instructions and were interpreted according to the clinical breakpoints for CLSI [6] and BrCAST/EUCAST [7].

Phenotypic screening for carbapenemase detection

2.3.1 - MHT was performed for all isolates as recommended by the CLSI instructions [6]. To investigate the performance of both substrates, ERT and MPM disks were used. As required for quality control, the following strains were tested: *Escherichia coli* ATCC 25922 (indicator strain), *K. pneumoniae* BAA 1705 (KPC producer, positive control), *K. pneumoniae* BAA 1706 (non-carbapenemase producer, negative control). The presence of a distorted zone after an overnight incubation was interpreted as a positive result.

2.3.2 - The inhibitor-based method was performed for all isolates according to BrCAST/EUCAST [7] recommendations. The test was performed with ERT and MPM disks alone and with disks supplemented with 10 µl of three β-lactamase inhibitors: 40 mg/ml PBA (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Germany), 0.1 M EDTA (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Germany) and 75 mg/ml CLOXA (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Germany). An

increase of ≥ 5 mm in zone diameter around the disks containing β -lactamase inhibitors compared to the carbapenem disk alone was considered a positive result.

3 - Results and Discussion

KPC-producing *K. pneumoniae* has become widely disseminated in Brazil during the last decade, reflecting the horizontal and vertical transmission of KPC-encoding genes, the extensive use of antimicrobial agents and insufficient infection control measures [9,10]. Dissemination of KPC enzymes severely limits treatment options, as carbapenemase-producing strains are resistant to most available antibiotics [2,3]. We observed this resistance profile among 47 KPC-producing *K. pneumoniae* strains, as all presented with a MDR phenotype (non-susceptible to at least three antimicrobial classes) in the disk diffusion susceptibility assay using the 25 antibiotics. Furthermore, 30 strains (63.8%) were considered extremely drug resistant (XDR), being susceptible to only one or two antimicrobial classes, and two strains (4.3%) were considered pan-drug resistant (PDR) because they were resistant to all 25 antibiotics tested.

The detection of KPC-producing *K. pneumoniae* is challenging in the laboratory, since the MICs of carbapenems for carbapenemase producers are highly variable, and false-susceptibility results have been reported [1,3]. As expected, our results showed variations in carbapenem susceptibility testing between the different carbapenems, the method used and the clinical breakpoint (guidelines) adopted. The results of the classification of isolates as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R) to ertapenem, meropenem and imipenem using each test method and interpretation according to the CLSI and BrCAST/EUCAST breakpoints are provided in Table 1.

Among the carbapenems evaluated in this study, ERT (80.9% DD x 59.6% MIC by CLSI; 89.4% DD x 66% MIC by BrCAST) correctly selected a high number of KPC-producing strains using both methods (disk diffusion and MIC determination) and considering the criteria of both guidelines, followed by MPM (70.2% DD x 51.1% MIC by CLSI; 40.4% DD x 36.2% MIC by BrCAST) and IPM (51.1% DD x 53.2% MIC by CLSI; 34% DD x 38.3% MIC by BrCAST). ERT is described as the best choice to detect carbapenemases among *Enterobacteriaceae*, since it has higher sensitivity in susceptibility testing than MPM and IPM. However, ERT resistance can be due to other factors, such as ESBL with porin loss or AmpC hyperproduction. This variability means that no single carbapenem screening criterion should be used to identify all isolates.

To ensure higher accuracy in susceptibility testing, both committees recommend consider a strain as being resistant to carbapenems when the isolate in question is resistant to at least one carbapenem [3,11]. Our MIC determination results showed an increase in the number of strains considered carbapenem resistant, taking into account the resistance to at least one carbapenem (Table 1).

The disk diffusion method classified more resistant strains than the MIC determination method using both guidelines (80.9% DD x 66% MIC by CLSI; 89.4% DD x 68% MIC by EUCAST/BrCAST). Similar results have been obtained by others using KPC-producing strains [12]. One possible explanation for the lower accuracy in determining the MIC using the antimicrobial gradient method could be related to interpretation issues caused by the presence of scattered inner colonies in the inhibition zone. Therefore, the disk diffusion method to test all three carbapenems seems to be a useful tool in screening KPC-producing *K. pneumoniae*. This method showed higher accuracy and is more economical, since one Etest and M.I.C.E strips are much more expensive than one antibiotic disk. The clinical breakpoints established by EUCAST/BrCAST categorized more isolates as resistant to carbapenems than CLSI using both methods (80.9% DD x 66% MIC by CLSI; 89.4% DD x 68% MIC by BrCAST). The different breakpoints adopted by CLSI and EUCAST/BrCAST can be useful to guide clinical therapeutic choices but are not appropriate for detecting carbapenemases because other resistance mechanisms can lead to phenotypic resistance. Because of this, both committees adopted criteria to select isolates that should be submitted to confirmatory tests to detect carbapenemase production. In this context, the number of strains selected for confirmatory tests by the CLSI criteria was 42 (89.4%) and 39 (83%) using the disk diffusion and MIC determination methods, respectively. Using EUCAST/BrCAST criteria, all strains (100%) were selected by the disk diffusion method and 45 strains (95.7%) by MIC determination (Table 1).

These results reflect the differences in screening criteria. According to CLSI, strains that are non-susceptible (I or R) to at least one carbapenem should be investigated. In contrast, EUCAST/BrCAST established that strains with lower/reduced susceptibility to at least one carbapenem should be investigated and, because of this, provides screening breakpoints expressed in MIC or inhibition zones with values that are still classified as susceptible. That some carbapenemase-producing strains will be categorized as susceptible to carbapenems is expected, given that EUCAST/BrCAST

recommendations select a higher number of strains for confirmatory tests. This was observed in our results, since all the strains were selected by the disk diffusion method and only two were not selected by MIC determination (4.3%). This was in contrast with CLSI, which selected fewer strains (42/89.4% by disk diffusion and 39/83% by MIC determination). To reiterate, we observed that using the disk diffusion method with the EUCAST/BrCAST screening criteria was the only method capable of selecting all strains.

There are few phenotypic techniques that are capable of successfully detecting all carbapenemase producers [18]. Because of this, CLSI suggests using MHT as a confirmatory test. In our study, the MHT results applying CLSI (2016) interpretation criteria detected carbapenemase production in 40 strains (85.1%) and for seven strains (14.9%), the result was negative. A possible explanation could be weak or non-carbapenemase production in these strains, as some research strains has shown that KPC enzyme expression is variable among *K. pneumoniae* strains [5,14].

The EUCAST/BrCAST guidelines for the detection of carbapenem resistance mechanisms do not recommend MHT as a confirmatory test because they consider it to have a low specificity and to lack the sensitivity to detect the presence of class B carbapenemases (NDM, for example). This guideline indicates the use of inhibitor-based tests such as phenotypic carbapenemase confirmation. Unlike MHT, with inhibitor-based tests, it is possible to distinguish the specific carbapenemase class involved; additionally, this method is well validated and has demonstrated high sensitivity and specificity [4,15].

The inhibitor-based method detected 37 (78.7%) strains that were positive for PBA, three strains (6.4%) that were simultaneously positive by both PBA and EDTA, seven strains (14.9%) that exhibited an absence of synergism and no strains that were positive for CLOXA (no AmpC producers were detected). The classification following the interpretation algorithm proposed by the EUCAST/BrCAST guideline indicated that 40 strains (85.1%) were carbapenemase producers: 37 (78.7%) were class A carbapenemase producers (KPC and others) and three (6.4%) were class A and B carbapenemase producers. The seven strains (14.9%) that did not exhibit synergism were considered non-carbapenemase producers, and in agreement with EUCAST/BrCAST, the most likely phenotypic resistance mechanism to carbapenems

would be caused by ESBL plus porin loss. These seven strains are the same ones that showed negative MHT results.

The negative results of the seven strains in confirmatory tests could be related with variation in carbapenemase production or even *bla*_{KPC} non-expression, since KPC production likely requires some *in vivo* stimulus [16]. Low expression of carbapenemase could contribute to the undetected dissemination of resistant strains in a hospital setting, since these strains can show sensitive MICs to carbapenems or negative results in confirmatory tests [17]. In our study, almost half of MHT and inhibitor-based negative strains showed sensitivity to all carbapenems using the DD method (CLSI) and MIC determination (CLSI and EUCAST/BrCAST) (Table 2). These strains would be reported as susceptible to carbapenems despite carrying the *bla*_{KPC} gene, suggesting that these isolates are not expressing the gene *in vitro* or are doing so at a level that was not detected by our methods. This profile was not observed for the disk diffusion method applying EUCAST/BrCAST criteria, since all strains were resistant to at least one carbapenem.

We observed an agreement between the presence of *bla*_{KPC} and phenotypic test results for 40 strains (85.1%). Considering the clinical impact of classification criteria of a ‘very major error’ (gene presence and negative phenotypic test result) or a ‘minor error’ (gene absence and positive phenotypic test result), the seven negative phenotypic test strains were classified as ‘very major error’, since they could lead to inadequate therapy and, furthermore, would not be considered in epidemiological statistics, leading to underestimated data. Furthermore, a mistaken susceptible classification could have an important clinical impact because it could lead to treatment failure, since carbapenems are still a choice in the treatment of carbapenem-susceptible strains, and carbapenemase expression can be reverted *in vivo* [18].

In conclusion, our results support that the clinical breakpoints of carbapenems for the *Enterobacteriaceae* family and the screening criteria used to select strains proposed by EUCAST/BrCAST performed better than the CLSI to correctly select *K. pneumoniae* strains possessing *bla*_{KPC} for confirmatory tests. It is important to use all three carbapenems to ensure a high accuracy in susceptibility testing. Furthermore, we observed that using the disk diffusion method and applying the European/Brazilian

criteria was the only method capable of correctly selecting all strains for confirmatory tests. Both confirmatory tests (MHT and the inhibitor-based method) identified carbapenemase production in the same strains; however, the inhibitor-based method suggested by EUCAST/BrCAST can distinguish the enzyme class involved, and it is also an easy method to perform and is economically viable for use in clinical laboratories. All analyses in this study were restricted to KPC-producing *K. pneumoniae*, since this species is the principal species carrying this carbapenem resistance mechanism is endemic in Brazil and can be found worldwide [1].

ATB- Antibiotic; ERT- Ertapenem; IPM- Imipenem; MPM- Meropenem; MIC- Minimum Inhibition Concentration; S- Susceptible; I- Intermediate; R- Resistant
*Considering the 3 carbapenems results.

Table 2 – Genetic and phenotypic profile from 7 *K. pneumoniae* strains with negative results in confirmatory tests.

Strain	Genes detected	CLSI*		EUCAST/BrCAST*		MHT	Inhibitor-based method
		DD	MIC	DD	MIC		
15B	KPC+TEM+SHV+CTX-M	S	S	R	S	NEG	NEG
43B	KPC+SHV+CTX-M	S	S	R	S	NEG	NEG
100B	KPC+TEM+SHV+CTX-M	S	S	R	S	NEG	NEG
17B	KPC+SHV	S	R	R	R	NEG	NEG
45B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	S	NEG	NEG
11B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	R	NEG	NEG
26B	KPC+SHV+OXA-1+CTX-M	R	R	R	R	NEG	NEG

DD – Disk Diffusion; MIC – Minimum Inhibitory Concentration; MHT – Modified Hodge Test; NEG – Negative; S – Sensible; R – Resistant.

*The strain was resistant when showed resistance to at least one carbapenem.

4 - ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Public Health Central Laboratory of Espírito Santo (LACEN) for supplying the *K. pneumoniae* strains. Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Competing interests: None declared. Ethical approval: Not required.

REFERENCES

- [1] Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–30. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- [2] Bulik, C. C., Fauntleroy, K. A., Jenkins, S. G., Abuali, M., LaBombardi, V. J., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2010). Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2402–2406. <http://doi.org/10.1128/JCM.00267-10>
- [3] Birgy, A., Bidet, P., Genel, N., Doit, C., Decré, D., Arlet, G., & Bingen, E. (2012). Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in

carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1295–1302. <http://doi.org/10.1128/JCM.06131-11>

[4] Van Dijk, K., Voets, G. M., Scharringa, J., Voskuil, S., Fluit, A. C., Rottier, W. C., ... Cohen Stuart, J. W. T. (2014). A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 345–349. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12322>

[5] Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., ... Cornaglia, G. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 432–438. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x>

[6] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016

[7] BrCAST -Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST/EUCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos – Version in portuguese of the EUSCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2017). <http://brcast.org.br/documentos/>. Accessed 1 april 2017

[8] BrCAST -Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST/EUCAST). Método de Disco-difusão do EUCAST para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos - Version in portuguese of the EUCAST Disk Diffusion Method (2015). <http://brcast.org.br/documentos/>. Accessed 1 june 2016.

[9] Hou, X., Song, X., Ma, X., Zhang, S & Zhang, J. (2015). Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 3, 759-768. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140138>

[10] Sampaio, J. L., & Gales, A. C. (2016). ARTICLE IN PRESS Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*, 47, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>

[11] Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., & Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 106–118. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>

- [12] Maurer, F. P., Castelberg, C., Quiblier, C., Bloemberg, G. V., & Hombach, M. (2015). Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 95–104. <http://doi.org/10.1128/JCM.01692-14>
- [13] Genc, O., Aksu, E., & Gulcan, A. (2016). The identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. *Journal of Microbiological Methods*, 125, 8–11. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.010>
- [14] Landman, D., Bratu, S., & Quale, J. (2009). Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 58(10), 1303–1308. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.012575-0>
- [15] Giske, C. G., Gezelius, L., Samuelsen, Warner, M., Sundsfjord, A., & Woodford, N. (2011). A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 552–556. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x>
- [16] Roth, A. L., Lister, P. D., & Hanson, N. D. (2013). Effect of drug treatment options on the mobility and expression of bla_{KPC}. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2779–2785. <http://doi.org/10.1093/jac/dkt280>
- [17] Meletis, G., Chatzidimitriou, D., & Malisiovas, N. (2015). Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(8), 1487–1493. <http://doi.org/10.1007/s10096-015-2379-9>
- [18] Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(9), 785–796. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)